

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Kučerová

Mechanismy translační represe zprostředkované miRNA
miRNA-mediated translational repression

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své práce, RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D., za jeho čas mně věnovaný při konzultacích a také za možnost pracovat v laboratoři biochemie RNA.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.05.2019

.....

Michaela Kučerová

Obsah

Seznam zkratk a slovníček cizích pojmů	VI
Abstrakt	IX
1 Úvod a cíl práce:	1
2 Hlavní způsoby zpracování molekuly mRNA po vstupu do cytoplazmy:	2
2.1 <i>Iniciace translace:</i>	2
2.2 <i>miRNA a RNA interference:</i>	3
2.3 <i>Degradační dráhy mRNA:</i>	4
3 Hlavní proteiny účastníci se mechanismu translační represe:	6
3.1 <i>AGO</i>	6
3.1.1 Základní informace:	6
3.1.2 Sekvenční uspořádání proteinů AGO:	6
3.1.3 Interakce proteinů AGO a jejich role ve zprostředkování translační represe:	7
3.2 <i>GW182</i>	8
3.2.1 Základní informace:	8
3.2.2 Sekvenční motivy a doménové uspořádání GW182:	8
3.2.3 Proteinové interakce GW182 a jeho role v translační represí:	9
3.3 <i>PAN2-PAN3</i>	9
3.3.1 Základní informace:	9
3.3.2 Sekvenční motivy a terciární struktura:	10
3.3.3 Proteinové interakce komplexu PAN2-PAN3 a jeho role v translační represí:	11
3.4 <i>CCR4-NOT</i>	11
3.4.1 Základní informace:	11
3.4.2 Sekvenční motivy a doménové uspořádání CCR4-NOT:	12
3.4.3 Proteinové interakce komplexu CCR4-NOT a jeho role v translační represí:	12
4 Mechanismy translační represe zprostředkované pomocí miRNA:	13
4.1 <i>Odstranění proteinu PABP zprostředkované pomocí proteinu GW182</i>	15
4.2 <i>Translační represe nezávislá na proteinu GW182</i>	16
4.3 <i>miRNA-zprostředkované odstranění nebo navázání helikáz eIF4A1 a eIF4A2</i>	17
4.4 <i>Rekrutování translačních inhibitorů na mRNA</i>	18
4.4.1 CAF1	18
4.4.2 4E-T	19
4.4.3 eIF4E2 (4EHP)	20
4.4.4 GIGYF2	22
5 Závěr:	25
Seznam použité literatury	26

Seznam zkratk a slovníček cizích pojmů:

V práci se čteně vyskytují anglické pojmy, u nichž český ekvivalent neexistuje nebo není výstižný. Pro upřesnění toho, v jakém smyslu tyto anglické výrazy používám, přikládám slovníček anglických pojmů a seznam zkratk.

Anglické výrazy:

Cap – „čepička“ – m⁷G čepičková struktura

Cap-to-tail propojení – propojení, které vzniká při iniciaci translace, kdy molekula mRNA cirkularizuje za pomoci iniciačních translačních faktorů, propojení „čepička“ a „ocas“

Closed-loop – model „uzavřené smyčky“, který značí stejný termín jako zde použité *cap-to-tail*

Coiled coil struktura – struktura „svinuté cívky“, interakce dvou vláken, ty se ovíjí kolem sebe tak, aby hydrofobní/hydrofilní zbytky byly v interakci s prostředím co nejstabilnější

Core – proteinové „jádro“, vnitřní část proteinu

Decapping – odštěpení čepičkové struktury

Guide molekula – navádějící

Linker – spojovník, spojovací sekvence

Target – cílová sekvence/molekula

Knock-down – odstranění, např. sekvence genu pro protein

P-bodies – Processing bodies, cytoplasmická ribonukleoproteinová tělíska, do nichž lokalizují mRNA a proteinové komponenty 3'-5' degrační dráhy mRNA, deadenylační faktory, některé proteiny miRNA- a NMD- (Nonsense mediated decay) zprostředkované RNA degradace a translační represory

Silencing – zde použito ve smyslu miRNA-zprostředkovaného posttranskripčního umlčování genů

Tag/tagovat – označit, např. MBP kotvou

Wild-type – divoký fenotyp nebo přirozená nemutovaná forma proteinu

Zkratky:

3'UTR – 3'untranslated region, 3'netranslatovatelná oblast

5'UTR – 5'untranslated region, 5'netranslatovatelná oblast

43S – eukaryotický přediniciační komplex

48S – eukaryotický iniciační komplex

40S – malá podjednotka eukaryotního ribozomu

60S – velká podjednotka eukaryotního ribozomu

80S – eukaryotní ribozom

GAP – GTPase-activating protein, regulační protein vážící se k aktivovaným G proteinům stimulující jejich GTPázovou aktivitu

GEF – Guanine nucleotide exchange factor, protein stimulující disociaci GDP potřebnou po výměnu za GTP

LRR – leucin rich repeats, proteinové repetice bohaté na leucin

miRNA – microRNA, malá nekódující RNA

miRISC – miRNA induced silencing complex, ribonukleoproteinový komplex, který vyhledá cílovou mRNA a zprostředkuje inhibici její exprese pomocí RNA interference

siRNA – small interfering RNA, malé interferující RNA

shRNA – short hairpin RNA, uměle konstruovaná RNA používající se v cíleném umlčování genové exprese mechanismem RNA interference

tRNA_i^{Met} – iniciační tRNA nesoucí aminokyselinu methionin

Seznam proteinů:

AGO1 – 4 – protein Argonaut, společně s miRNA či siRNA vytváří funkční RISC

CCR4-NOT – hlavní deadenylační komplex eukaryotické buňky

CAF1 – deadenyláza komplexu CCR4-NOT

CCR4 – deadenyláza komplexu CCR4-NOT

CNOT1, 2, 3, 9, 10, 11, 6, 6L, 7, 8 – podjednotky lidského CCR4-NOT

DCP1-DCP2 – proteinový komplex odštěpující čepičkovou strukturu

DCP2 – pyrofosfatáza „*decapping*“ komplexu DCP1-DCP2

DDX6 – helikáza, translační represor, též rekrutuje „*decapping*“ proteinové faktory

DGCR6 – lidský homolog proteinu Pasha

Dicer – nukleáza zodpovědná za vznik duplexu miRNA štěpením pre-miRNA

Drosha – nukleáza zodpovědná za vznik pre-miRNA z pri-miRNA za spoluúčasti DGCR8/Pasha

eIF1 – eukaryotní iniciační faktor 1

eIF1A – eukaryotní iniciační faktor 1A

eIF2 – eukaryotní iniciační faktor 2

eIF2B – eukaryotní iniciační faktor 2B, GEF pro eIF2

eIF3 – eukaryotní iniciační faktor 3

eIF4A – eukaryotní iniciační faktor 4A, RNA helikáza, rozvolňuje sekundární struktury na mRNA

eIF4A2 – eukaryotní iniciační faktor 4A2, paralog eIF4A

eIF4B – eukaryotní iniciační faktor 4B, stimuluje helikázovou aktivitu eIF4A

eIF4E – eukaryotní iniciační faktor 4E, též nalezneme pod jménem eIF4E1, protein přímo se vázající na čepičkovou strukturu

eIF4E2 – eukaryotní iniciační faktor 4E2, funguje též jako translační represor, vytěsňuje eIF4E z vazby na eIF4G

eIF4F – komplex iniciačních faktorů vážící se na čepičku, který zprostředkovává cirkularizaci mRNA při iniciaci translace, skládá se z eIF4A/4A2, eIF4E, eIF4G a eIF4B

eIF4G – eukaryotní iniciační faktor 4G, proteinový „*scaffold*“ komplexu, váže eIF4A, eIF4E, mRNA, PABP a MNK1

eIF5 – eukaryotní iniciační faktor 5, GAP pro eIF2

eIF5B – eukaryotní iniciační faktor 5B, pomocí eIF5B-GTP je katalyzováno připojení 60S podjednotky

Exportin-5 – exportin přenášející pre-miRNA z jádra do cytosolu

4E-T – transportér eIF4E

GIGYF2 – translační represor, váže se na eIF4E2

GW182 – protein *D. melanogaster*, podněcuje „*silencing*“ vazbou na AGO, sám vykazuje represní funkci ohledně iniciace translace

Pasha – nukleáza *D. melanogaster* zodpovědná za vznik pre-miRNA z pri-miRNA za spoluúčasti proteinu Drosha

EDC3, EDC4 – Enhancer of decapping 3 a 4, proteiny aktivující odstranění čepičkové struktury

Lsm1-7 – kruh SM-*like* proteinů účastnící se odstranění čepičkové struktury

PAIP2 – PABP-interacting protein 2, váže PABP pomocí motivu PAM2 a podněcuje disociaci PABP podobně jako GW182

PARN – poly(A)-specifická nukleáza, eukaryotní deadenylace *in vivo* se nejspíše neúčastní

PABP – poly(A)-vazebný protein, zprostředkovává cirkularizaci mRNA při iniciaci translace pomocí interakce s eIF4F

PAN2-PAN3 – deadenylační komplex eukaryotické buňky

PAN2 – katalytická podjednotka PAN2-PAN3

PAN3 – podjednotka PAN2-PAN3, která tvoří specifické homodimery a váže GW182

Pat1 – protein „*decapping*“ komplexu

TNRC6A – C – lidské homology GW182

XRN1 – hlavní 5'-3'exoribonukleáza v eukaryotních buňkách

Abstract:

Recent models of miRNA-mediated translational repression favor initiation as the phase of translation, where the repression is primarily evoked. miRNA-induced silencing complex utilizes miRNA as a guide molecule to find its target mRNA. To inhibit mRNA translation and induce its decay, many other proteins are then recruited, e.g. GW182 protein, PAN2-PAN3 a CCR4-NOT deadenylation complexes, decapping enzyme and eIF4E-binding proteins. miRNA-mediated translational repression is then established by either their concerted action or their consecutive and coordinated binding to target mRNA. To date, several mechanisms have been described: GW182-mediated PABP displacement; GW182-independent translational repression; miRNA-mediated eIF4A1 dissociation or eIF4A2 recruitment; translational repression mediated by deadenylases CAF1 and CCR4; and 4E-T, eIF4E2, GIGYF2 translational repressor proteins recruitment. Here, I provide up-to-the-minute summarization of these mechanisms with the aim to extract any universality from them.

Keywords: miRNA; translational repression; mRNA deadenylation; mRNA decay; GW182; PAN2-PAN3; CCR4-NOT; 4E-T; eIF4E2; GIGYF2

Abstrakt:

Současný model na mechanismus translační represe zprostředkované pomocí miRNA upřednostňuje model, kde k jejímu ustanovení dochází během iniciačního kroku translace. miRNA funguje jako naváděcí molekula, která směřuje miRISC (miRNA-induced silencing complex) k cílové mRNA. Aby byla mRNA translačně reprimována nebo byla indukována její degradace, je zapotřebí navázání dalších proteinů, např.: proteinu GW182, deadenylačních komplexů PAN2-PAN3 a CCR4-NOT, „*decapping*“ enzymu či eIF4E-vazebných proteinů. Společnou souhrou těchto bílkovin nebo jejich posupným a koordinovaným navázáním na cílovou mRNA dochází k ustanovení translační represe. Zatím bylo navrženo několik jejích mechanismů: odstranění proteinu PABP z mRNA zprostředkované proteinem GW182; translační represe ustanovená nezávisle na proteinu GW182; miRNA-zprostředkované odstranění nebo navázání helikáz eIF4A1 či eIF4A2; translační represe navozená deadenylázami CAF1 a CCR4 a rekrutování translačních represorů jako jsou proteiny 4E-T, eIF4E2 a GIGYF2. Ve této práci shrnuji nejnovější informace o translační represí s cílem najít sjednocující prvky v jejích jednotlivých navržených mechanismech.

Klíčová slova: miRNA; translační represe; deadenylace mRNA; degradace mRNA; GW182; PAN2-PAN3; CCR4-NOT; 4E-T; eIF4E2; GIGYF2

1 Úvod a cíl práce:

Inhibice translace představuje důležitou součást regulace genové exprese eukaryotické buňky. Ačkoliv je tento proces usilovně zkoumán, jeho přesný mechanismus není plně objasněn díky stále se objevujícím novým interakčním proteinovým partnerům. Dnes se upřednostňuje model translační represe indukované během iniciační fáze translace. Současné studie se také snaží zodpovědět, zda dochází nejprve k zablokování translace a pak k následné degradaci transkriptu, či represe translace je jen prvním krátkým mezistupněm procesu vedoucího k degradaci mRNA. Recentní výsledky naznačují, že jde o dva vzájemně oddělené následné procesy probíhající velmi rychle za sebou, přičemž represe předchází degradaci.

Cílem práce bylo nashromáždit současné poznatky týkající se translační represe zprostředkované miRNA, vytvořit souhrnný článek zabývající se jejím mechanismem a podle dostupné literatury navrhnout možný interakční koncept.

První část mé práce je proto spíše popisná – představuje hlavní proteinové komponenty zúčastňující se iniciace translace, miRNA degradační dráhy a proteiny, které fungují jako translační inhibitory. Nasměrování mRNA do translačně nekompetentního stavu nebo degradace je regulováno sestavením příslušných proteinových komplexů. Proto pochopení struktury jednotlivých proteinových hráčů a uspořádání jejich proteinových domén, které zprostředkovávají mnohočetné a komplexní proteinové interakce, slouží čtenáři jako nutný teoretický podklad k pochopení samotných schémat represe translace.

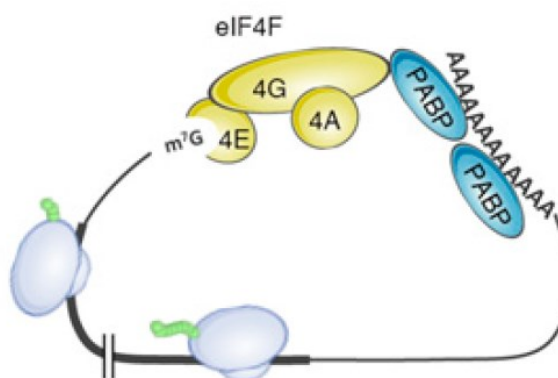
Druhá část mé práce shrnuje současné poznatky v této oblasti, rozebírá možná schémata represe translace a při jejich popisu vychází z údajů části první. Tato kapitola se snaží navrhnout zobecněné schéma fungování a složení proteinových komplexů, které regulují miRNA-zprostředkovanou inhibici translace.

2 Hlavní způsoby zpracování molekuly mRNA po vstupu do cytoplazmy:

- a) dochází k bezprostřednímu překladu mRNA,
- b) dochází k posttranskripční inhibici genové exprese RNA interferencí,
- c) dochází k bezprostřední degradaci mRNA. Degradace mRNA může být vyústěním RNA interference.

2.1 Inicie translace:

Eukaryotní mRNA je opatřena na svém 5' konci čepičkovou strukturou a na 3' konci polyadenylována. Tyto posttranskripční modifikace umožňují molekule mRNA zaujmout kruhovou strukturu typu „cap-to-tail“, kde se 7^mG čepička a poly(A) spojují prostřednictvím specifických interagujících proteinů komplexu eIF4F a proteinu PABP (Obrázek č.1).



Obrázek č.1: Model mRNA během iniciace translace. mRNA cirkularizuje „cap-to-tail“ spojením. (Chapat *et al.* 2017)

Proteinový komplex eIF4F se skládá z proteinů eIF4A, eIF4B, eIF4E a eIF4G. eIF4A je RNA helikáza rozvolňující sekundární struktury v 5' nepřekládaných oblastech molekul mRNA při procesu skenování, tedy mechanismu, kdy dochází k nalezení iniciačního kodónu ve vhodném sekvenčním kontextu skenujícím 48S přediniciačním komplexem. Stejná funkce je přiřítána i jeho paralogu, eIF4A2 (Lu *et al.* 2014). eIF4E představuje hlavní čepičku vázající protein eukaryotických buněk. Vzhledem k tomu, že práce popisuje i další proteiny obdobného typu, v dalším textu se objevuje též pod názvem eIF4E1. eIF4G funguje jako proteinové lešení („scaffold“), které na sebe váže eIF4A, eIF4E, eIF3, PABP a proteinkinázu MNK1. U samotného eIF4G byla popsána též RNA-vazebná specifita (Berset *et al.* 2003). PABP váže polyadenylovaný konec mRNA (Gingras, Raught and Sonenberg 1999, Lu *et al.* 2014).

mRNA vázaná komplexem eIF4F je přiváděna k malé ribozomální podjednotce 40S prostřednictvím faktoru eIF3, který se na ni bezprostředně váže. Tento translační faktor sestávající z několika podjednotek je součástí tzv. multifaktoriálního komplexu, kde se nachází společně s eIF1, eIF1A, eIF5. Multifaktoriální komplex byl dobře biochemicky charakterizován v kvasinkových buňkách, jeho přesná podoba u savců je stále předmětem diskuze (Hinnebusch and Lorsch 2012). Výsledkem interakcí 40S, multifaktoriálního komplexu a ternárního komplexu faktoru eIF2 (GTP-eIF2-iniciátorová tRNA^{Met}) vzniká tzv. přediniciační komplex 43S, který po

vazbě s eIF4F-mRNA vytváří 48S přediniciační komplex. Ten skenuje 5'UTR mRNA dokud nedojde k nalezení iniciačního kodónu AUG v rámci konsenzus sekvence Kozakové (ve většině případů). Toto prohledávání 5'UTR probíhá za účasti eIF4A, jejíž helikázová aktivita je stimulována faktorem eIF4B. eIF5 funguje jako GAP (GTPase-activating protein) a podněcuje hydrolýzu eIF2-GTP. Skenující 48S je charakterizován otevřenou konformací malé ribozomální podjednotky, tzv. P_{out} stavem iniciátorové tRNA a proběhnuvší hydrolýzou GTP, avšak bez uvolnění fosfátu z vazebného místa na eIF2. Po rozpoznání iniciačního kodónu AUG dojde ke změně konformace z otevřené na uzavřenou, antikodón iniciátorové tRNA páruje s iniciačním kodónem (P_{in} stav), eIF1 disociuje a P_i je uvolněn z eIF2. eIF2-GDP, eIF1A a eIF5 disociují a eIF2-GDP je recyklován pomocí eIF2B do dalšího kola iniciace. Připojení 60S podjednotky je katalyzováno pomocí další GTPázy, eIF5B. Výsledkem těchto dějů je vytvoření 80S ribozómu, který je kompetentní přejít do fáze elongace translace (Hinnebusch and Lorsch 2012).

2.2 miRNA a RNA interference:

miRNA jsou asi 20 – 24 nukleotidů dlouhé malé nekódující RNA, které jsou schopny účastnit se tvorby komplexu miRISC (miRNA-induced silencing complex) a zprostředkovávat tak posttranskripční regulaci genové exprese u živočichů, rostlin i protist. Odhaduje se, že pomocí miRNA je regulováno více než 50% savčích mRNA (Friedman *et al.* 2009, Fabian, Sonenberg and Filipowicz 2010).

miRNA se účastní mechanismu RNA interference. Ve vazbě s AGO proteiny tvoří regulační miRISC komplex, který zprostředkovává inhibici genové exprese. miRNA párují nedokonale se svojí cílovou sekvencí, která se většinou nachází v 3'UTR (3'untranslated region) takto regulovaných mRNA. Plná sekvenční komplementarita nastává většinou v části miRNA, která se označuje jako „seed“ oblast. Ta se v drtivé většině případů nachází v pozici 2-7nt miRNA. Dokonalá komplementarita mezi mi/siRNA a mRNA v RISC komplexu většinou navozuje přímé štěpení molekul mRNA (Bushati and Cohen 2007).

Geny pro miRNA jsou majoritně přepisovány RNA polymerázou II. Nejprve dojde k syntéze pri-miRNA s vlásenkovými strukturami. Pri-miRNA je poté v jádře rozstříhána enzymy Drosha a DGCR8/Pasha za vzniku pre-miRNA. Jaderný export je zprostředkován exportinem-5. V cytoplasmě nastává další enzymatická úprava enzymem Dicer, který vytváří asi 20nt dlouhý duplex miRNA. Vlákno s relativně nižší termodynamickou stabilitou na svém 5'konci je poté většinou použito jako tzv. „guide“ vlákno, které slouží ke zformování funkčního miRISC komplexu. Druhé vlákno miRNA, tzv. „passenger“, je degradováno. miRNA poté naviguje RISC na cílové molekuly mRNA (Bushati and Cohen 2007).

Dnes se miRNA přisuzuje hlavně role regulační, s důrazem na posttranskripční umlčování genů. Na druhou stranu byla popsána též i translačně aktivační funkce miRNA (Vasudevan, Tong and Steitz 2007, Orom, Nielsen and Lund 2008, Henke *et al.* 2008).

V případě zvýšené aktivity miRNA-zprostředkované degradace komponenty rozpadlého miRISC společně s reprimovanou mRNA lokalizují do cytoplazmických struktur, tzv. P-bodies (Processing bodies) (Fabian, Sonenberg and Filipowicz 2010).

2.3 Degradací dráhy mRNA:

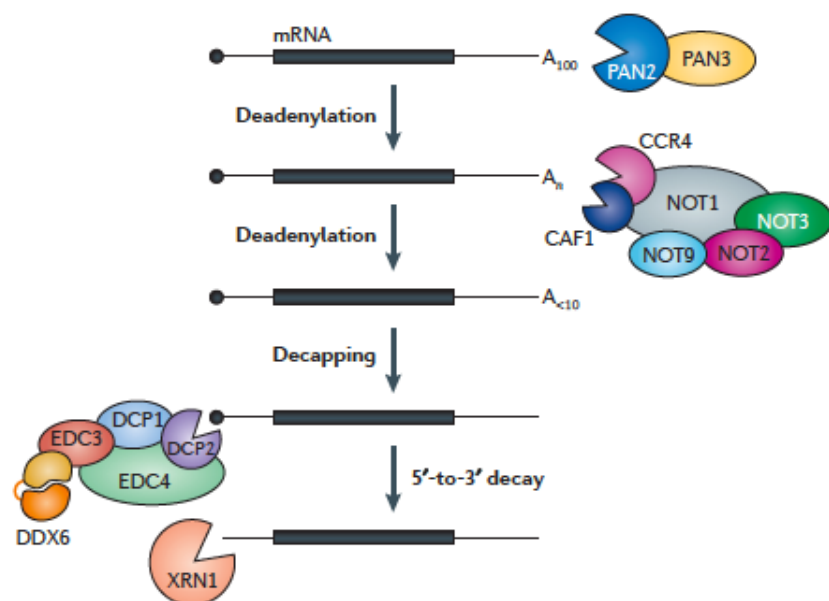
Degradace mRNA je komplexním a vysoce regulovaným procesem buněčné regulace genové exprese. Zpravidla eukaryotní mRNA mohou v buňce existovat v řádech desítek minut i hodin a jejich stabilita je ovlivněna v závislosti na vývojovém a metabolickém stavu buňky, podmínkách prostředí a je primárně ovlivněna přítomností růstových a transkripčních faktorů a RNA asociovaných proteinů. Degradace mRNA je také vyústěním jakýchkoli defektů v přesnosti post-transkripčních úprav mRNA a možným výsledkem RNA interference.

Jak už bylo řečeno, eukaryotní mRNA je na 5' konci chráněna čepičkovou strukturou a na 3' konci poly(A) sekvencí, která je nejprve zkrácena na délku přibližně 50 adenosinů pomocí komplexu PAN2-PAN3. Molekula je dále deadenylována komplexem CCR4-NOT (Obrázek č. 2). Při vyřazení funkce PAN2-PAN3 nejspíše může CCR4-NOT zprostředkovat efektivní deadenylaci sám (Yamashita *et al.* 2005).

Deadenylovaná mRNA může být degradována exosomem ve směru 3' - 5'. Další možností je degradace ve směru 5' - 3'. Je totiž dobře popsáno, že zkrácení poly(A) konce na méně než 10 adenosinů stimuluje odštěpení čepičkové struktury pomocí tzv. „decapping“ enzymového komplexu DCP1-DCP2. Obnažený 5' konec mRNA je poté přístupný degradaci zprostředkované hlavní buněčnou 5' - 3' exoribonukleázou XRN1 (Houseley and Tollervey 2009).

DCP2-zprostředkovaný „decapping“ může sloužit jako první krok podněcující degradaci mRNA nezávisle na iniciaci deadenylace pomocí PAN2, a tak být „záložním mechanismem“ za PAN2. K akumulaci polyadenylovaných mRNA totiž dochází jen při současném narušení funkce DCP2 a PAN2 (Yamashita *et al.* 2005).

DCP2 představuje katalytickou pyrofosfatázu enzymového komplexu DCP1-DCP2. DCP1 je koaktivátorem DCP2, nicméně v „decapping“ komplexu jsou přítomné ještě další stimulující proteiny, např.: EDC3, EDC4 (Enhancer of decapping 3 a 4), DDX6 (helikáza, DEAD box protein 6), protein Pat1 a komplex Lsm1-7 (kruh SM-like proteinů 1-7) (Arribas-Layton *et al.* 2013).



(Jonas and Izaurralde 2015)

Obrázek č.2: Zjednodušené schéma 5'-3' degrační dráhy mRNA. Černé kolečko na 5'konci mRNA znázorňuje čepičku; A_{100} , A_n , $A_{<10}$: přibližná délka poly(A) konců mRNA typických pro jednotlivé enzymatické kroky.

3 Hlavní proteiny účastníci se mechanismu translační represe:

3.1 AGO

3.1.1 Základní informace:

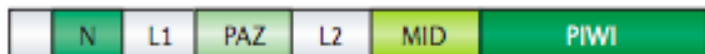
AGO, neboli proteiny Argonaut, jsou bílkoviny používající miRNA a siRNA jako *guide* (navádějící) molekuly, pomocí kterých vyhledávají komplementární cílové mRNA. Ty jsou buďto rovnou štěpeny vlastní endonukleolytickou aktivitou AGO, nebo je jejich translační represe a následná degradace zapříčiněna dalšími proteinovými faktory, které proteiny AGO rekrutují.

U savců nalezneme 4 zástupce této proteinové rodiny, AGO1 – AGO4. Jsou biochemicky i funkčně odlišné, přičemž pouze AGO2 je schopný katalytického štěpení. Tato vlastnost je důležitá pro správný vývoj savčího embrya. AGO 1, 3 a 4 jsou u savců postradatelné. U octomilky byly identifikovány pouze dva zástupci s tím, že AGO1 preferenčně lokalizuje s miRNA, zatímco AGO2 s siRNA (Liu *et al.* 2004).

3.1.2 Sekvenční uspořádání proteinů AGO:

Protein AGO se obecně skládá ze 4 sekvenčních domén – N-terminální, PAZ (PIWI-AGO-ZWIELLE), MID a PIWI a dvou spojovacích „*linker*“ oblastí (Obrázek č.3). Tyto domény jsou evolučně konzervovány, nalezneme je jak u bakteriálních, tak u eukaryotních zástupců. Celková terciární struktura bakteriálního AGO byla určena v roce 2004 rentgenovou krystalografií za použití Argonaut proteinu z archebakterie *P. furiosus* (Song *et al.* 2004), v roce 2012 byla následně publikována struktura lidského AGO2 (Schirle and MacRae 2012).

a *H. sapiens* AGO2



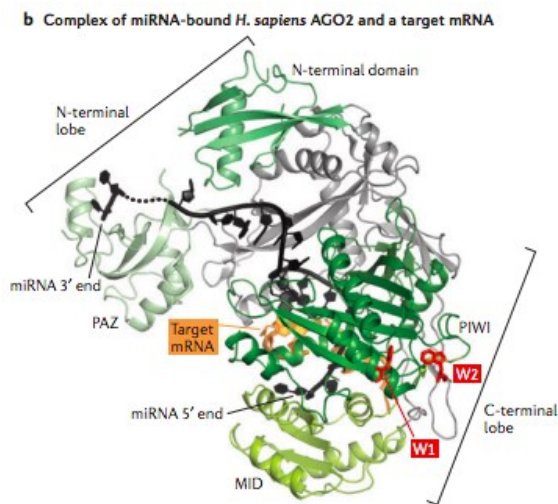
(Jonas and Izaurralde 2015)

Obrázek č.3: Uspořádání jednotlivých sekvenčních domén lidského proteinu AGO2.

3.1.3 Interakce proteinů AGO a jejich role ve zprostředkování translační represe:

AGO sám o sobě funguje jako Slicer, tedy protein komplexu RISC, který štěpí mRNA. Doména PIWI vykazuje aktivitu RNázy H, tudíž štěpí hybridizované duplexy mezi RNA a DNA. Doména PAZ rozeznává 3' konce siRNA. Produktem štěpení komplexem RISC jsou molekuly nesoucí 3' hydroxylové a 5' fosfátové skupiny; stejně jako u produktů štěpených RNázou H. Navíc pro správnou funkci RISC je třeba Mg^{2+} iontů, obdobně jako u RNázy H (Song *et al.* 2004). Na druhou stranu, v lidském AGO2 potřeba hořečnatých iontů v 5' vazebném místě pro jeho enzymatickou aktivitu popsána nebyla (Schirle and MacRae 2012).

Je obecně známo, že proteiny asociující s AGO ve své sekvenci často obsahují glycin-tryptofanové sekvenční oblasti. Ty poté zprostředkovávají interakci s glycin-tryptofanovými vazebnými místy na AGO proteinu. Obrázek č. 4 zobrazuje dvě tato vazebná místa, která byla určena na povrchu domény PIWI, na protější straně od miRNA-vazebné oblasti (Schirle and MacRae 2012). Tryptofanové zbytky se v proteinech obsahujících oblasti bohaté na glycin a tryptofan většinou vyskytují ve dvojicích a jsou od sebe odděleny asi 8 – 14 aminokyselinovými zbytky (Eulalio *et al.* 2009a). Oligopeptid čítající 8 aminokyselin je velký asi 24Å, což přesně odpovídá vzdálenosti mezi dvěma tryptofan-vazebnými místy na povrchu AGO2 (Schirle and MacRae 2012).



(Jonas and Izaurralde 2015)

Obrázek č.4: Doménové uspořádání a terciární struktura lidského AGO2 a vizualizace vazebných míst pro proteiny bohaté na glycin a tryptofan (tzv. GW proteiny). miRNA černě, cílová mRNA oranžově. V rámci N-terminálního laloku je značena N-terminální doména tmavě zeleně, doména PAZ světle zeleně. V rámci C-terminálního laloku doména MID světle zeleně, doména PIWI tmavě zeleně. Glycin-tryptofanová vazebná místa W1 a W2 se nachází na povrchu PIWI domény na protější straně od miRNA-vazebné oblasti (Jonas and Izaurralde 2015).

3.2 GW182

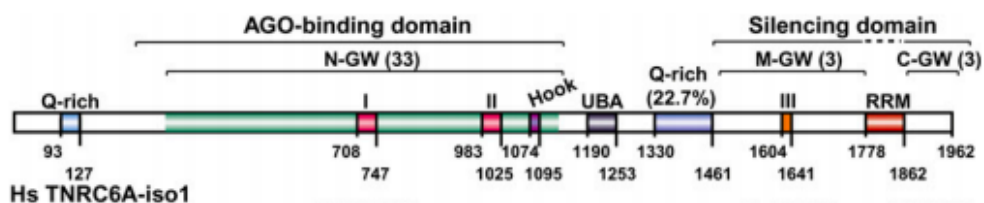
3.2.1 Základní informace:

Protein GW182 byl poprvé identifikován v séru pacientů trpících sensorickou a motorickou neuropatií jako proteinový antigen velký 182 kDa. Pro své četné opakování glycín-tryptofanových (GW) aminokyselinových zbytků byl nazván jako GW182 (Eystathiou *et al.* 2002). Svými glycín-tryptofanovými zbytky zprostředkovává interakci s proteiny AGO, s podjednotkou PAN3 deadenylačního komplexu PAN2-PAN3 a podjednotkami NOT1 a NOT9 deadenylačního komplexu CCR4-NOT.

U octomilky byl popsán jeden proteinový zástupce, GW182, zatímco u člověka nalezneme tři homology: TNRC6A, TNRC6B a TNRC6C; u hád'átka jsou přítomné sekvenčně a funkčně příbuzné proteiny AIN-1 a AIN-2. Proteiny GW182 nebyly identifikovány u rostlin a hub (Behm-Ansmant *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2007).

3.2.2 Sekvenční motivy a doménové uspořádání GW182:

Proteinová rodina GW182 je charakteristická přítomností centrální ubiquitin-asociované domény (UBA), C-terminálního RNA rozpoznávacího sekvenčního motivu (RRM) a četných glycín-tryptofanových repetitiv. Ve struktuře nalezneme N-terminální, střední a C-terminální bloky glycín-tryptofanových repetitiv. Mezi UBA a RRM nalezneme oblast bohatou na glutamin (Q-rich). Uvnitř N-terminálních glycín-tryptofanových repetitiv byly popsány dva evolučně konzervované motivy I a II, důležité pro vazbu AGO, které jsou zhruba 50 aminokyselinových zbytků dlouhé (Obrázek č.5) (Behm-Ansmant *et al.* 2006).



(Eulalio, Tritschler and Izaurralde 2009c)

Obrázek č.5: Uspořádání proteinových domén lidského TNRC6A. Lidský TNRC6A se skládá z AGO-vazebné domény a „umlčovací“ domény. Protein obsahuje tři bloky glycín-tryptofanových repetitiv: N-GW, N-terminální; M-GW, middle, střední; C-GW, C-terminální. Q-rich, oblast bohatá na glutamin; UBA, centrální ubiquitin-asociovaná oblast; RRM, C-terminální RNA vazebný motiv; I a II, evolučně konzervované sekvenční motivy uvnitř N-GW; III, evolučně konzervovaný sekvenční motiv neznámé funkce (DUF, domain of unknown function) (Eulalio *et al.* 2009c)

3.2.3 Proteinové interakce GW182 a jeho role v translační represi:

Hlavním interakčním partnerem proteinu GW182 je protein AGO. Na modelovém organismu *D. melanogaster* bylo zjištěno, že k interakci AGO1 a GW182 dochází pomocí glycin-tryptofanových repetitivních motivů I proteinu GW182 a domény PIWI proteinu AGO1 (Eulalio *et al.* 2009a). U člověka byla definována tři vazebná místa pro AGO2. Všechna tato vazebná místa jsou vzájemně zastupitelná pro interakci s AGO2. První dvě z nich se nacházejí uvnitř N-terminální domény TNRC6A a jejich umístění je zachováno v rámci evoluce. Každý protein GW182 může díky více vazebným místům asociovat s vícero AGO proteiny najednou. (Lazaretti, Tournier and Izaurralde 2009).

Pomocí proteinu GW182 dochází k rekrutování deadenyláz na molekulu mRNA. TNRC6A – C specificky rekrutují komplexy PAN2-PAN3 a CCR4-NOT přímou interakcí s podjednotkami PAN3 a NOT9. TNRC6 tak vytvářejí pomyslnou interakční platformu, přes kterou deadenylační komplexy získají přístup k polyadenylovanému konci mRNA (Fabian *et al.* 2011).

Ve sekvenci GW182 v rámci umlčovací domény nalezneme sekvenční motiv PAM2, který zprostředkovává interakci s proteinem PABP (Huntzinger *et al.* 2010).

K vazbě CCR4-NOT dochází pomocí dvou fylogeneticky konzervovaných sekvenčních motivů CIM (CCR4-NOT interacting motif) nacházejících se v „*silencing*“ doméně GW182. CIM-1 se nachází v doméně M-GW, zatímco CIM-2 je umístěn v doméně C-GW. Oba tyto motivy interagují s podjednotkou NOT1, ale nejsou funkčně ekvivalentní. CIM-1 jen přispívá CIM-2 ve vazbě na komplex CCR4-NOT a podněcuje tím deadenylaci. Přítomnost CIM-1 bez CIM-2 není dostatečná k indukci deadenylace (Fabian *et al.* 2011, Huntzinger *et al.* 2013).

3.3 PAN2-PAN3

3.3.1 Základní informace:

Deadenylace mRNA molekuly zpravidla vyžaduje postupný účinek dvou enzymatických deadenylačních proteinových komplexů, PAN2-PAN3 a CCR4-NOT.

Prvním objeveným deadenylačním enzymem byla polyA-specifická nukleáza PAN (Sachs and Deardorff 1992). U savců i kvasinky bylo prokázáno, že komplex PAN2-PAN3 obsahuje dvě podjednotky, hlavní katalyticky procesivní PAN2 (Pan2p) a PAN3 (Pan3p) (Uchida, Hoshino and Katada 2004, Brown *et al.* 1996, Boeck *et al.* 1996). U mnohých eukaryot byla identifikována ještě třetí poly(A)-specifická nukleáza PARN, ta se ale deadenylace *in vivo* nejspíše neúčastní (Yamashita *et al.* 2005). Komplex PAN2-PAN3 je rekrutován na mRNA interakcí PAN3 s PABP. Nejprve zkrátí poly(A) konec na délku asi 50-100 nukleotidů, a poté je poly(A) konec úplně degradován komplexem CCR4-NOT (Yamashita *et al.* 2005, Tucker *et al.* 2001).

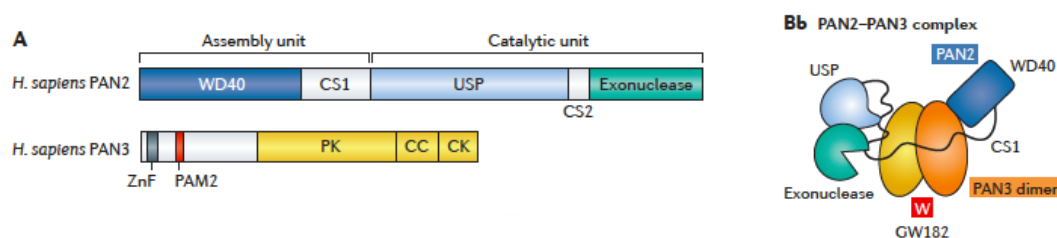
3.3.2 Sekvenční motivy a terciární struktura:

Komplex PAN2-PAN3 se skládá ze dvou podjednotek, PAN2 a PAN3. Ačkoli jen PAN2 je katalytická, pro správnou funkci je potřeba obou podjednotek.

Izolovaná PAN2 totiž není schopna vazby na RNA, k tomu jí pomáhá PAN3, která váže poly(A) RNA dvěma způsoby: a) sekvenčně nespecificky přímo pseudokinázovou a C-terminální doménou, b) poly(A) specificky pomocí N-terminálního CCCH-motivu zinkového prstu (Wolf *et al.* 2014).

Podjednotka PAN2 obsahuje tři globulární domény: N-terminální doménu WD40, ubiquitin-specifickou proteázu a exonukleázovou doménu. Tyto části proteinu jsou propojeny spojovacími sekvencemi CS1 a CS2. Podjednotka PAN3 obsahuje v rámci své N-terminální domény sekvenční motiv zinkových prstů a PABP-interagující motiv PAM2, dále se skládá z pseudokinázové domény, „coiled-coil“ domény a C-terminální domény (Obrázek č.6A) (Jonas and Izaurralde 2015).

Byly vytvořeny krystalové struktury proteinu PAN3 z *N. crassa* a *D. melanogaster*, které odhalily, že PAN3 tvoří asymetrické homodimery pomocí „coiled-coil“ struktury (struktura svinuté cívky), která propojuje pseudokinázovou a N-terminální doménu s C-terminální doménou (Obrázek 6B). Tato homodimerizace není vyžadována pro vazbu katalytické podjednotky PAN2, pravděpodobně proto, že každý monomer PAN3 má ve své C-terminální části vlastní povrch dostačující pro vazbu PAN2. Homodimer PAN3 vytváří na bázi „coiled-coil“ struktury glycin-tryptofanová vazebná místa pro vazbu GW182 (Christie *et al.* 2013).



(Jonas and Izaurralde 2015)

Obrázek č.6: Struktura komplexu PAN2-PAN3 a jeho interakce s GW182. (A) Doménová organizace lidských proteinů PAN2 a PAN3. PAN2: WD40, N-terminální doména; CS1, spojovací sekvence 1; USP, ubiquitin-specifická proteáza; CS2, spojovací sekvence 2; exonukleázová doména. PAN3: ZnF, sekvenční motiv zinkových prstů; PAM2, PABP-interagující motiv 2; PK, pseudokinázová doména; CC, „coiled-coil“ doména; CK, C-terminální doména. (B) Schéma prostorové organizace domén komplexu PAN2-PAN3. CC doména zprostředkovává homodimerizaci PAN3 a na své bázi vytváří glycin-tryptofanová vazebná místa (W – GW182). PAN2 může interagovat s C-terminální doménou PAN3 za přispěvku interakce WD40 a CS1 (Jonas and Izaurralde 2015).

3.3.3 Proteinové interakce komplexu PAN2-PAN3 a jeho role v translační represi:

Podjednotka PAN3 se na polyadenylovanou mRNA váže pomocí PABP a dále rekrutuje procesivní deadenylázu PAN2. PABP po navázání PAN2-PAN3 stimuluje nukleázovou aktivitu PAN2 (Uchida *et al.* 2004). Prostorové uspořádání obou podjednotek dovoluje podjednotce PAN3 poskytovat podjednotce PAN2 substrát poly(A) RNA, a tím podněcovat efektivní deadenylaci (Wolf *et al.* 2014).

Každý monomer PAN3 obsahuje motiv PAM2, který zprostředkovává interakci s C-terminální, protein-interagující doménou (PABC) proteinu PABP. Doména PABC se též nazývá MLLE, podle evolučně konzervované sekvence KITGMLLE (Kozlov *et al.* 2010). Tato doména interaguje specificky se všemi proteiny obsahujícími motiv PAM2, tedy kromě PAN3 ještě například s proteinem GW182 (Huntzinger *et al.* 2010).

3.4 CCR4-NOT

3.4.1 Základní informace:

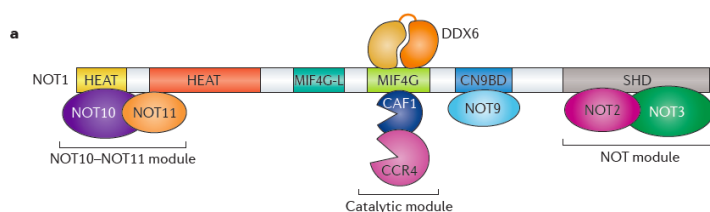
Komplex CCR4-NOT funguje jako cytoplazmatická deadenyláza, která se skládá z několika podjednotek. Centrální „scaffold“ podjednotkou je NOT1 (Negative on TATA-less), jenž váže dvě další podjednotky: 3'-5' exoribonukleázu CAF1 (CCR4-associated factor) a 3'-5' exoribonukleázu CCR4 (Carbon catabolite repression) (Basquin *et al.* 2012, Draper, Salvatore and Denis 1995, Sakai *et al.* 1992, Wahle and Winkler 2013). Komplex obsahuje několik proteinů typu NOT, např. „core“ lidského CCR4-NOT se skládá z proteinů CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT9, CNOT10, CNOT11. U lidí jsou dále přítomné asociované deadenylázy CNOT6, CNOT6L, CNOT7 a CNOT8 (Lau *et al.* 2009, Mauxion, Preve and Seraphin 2013). Podjednotky komplexu jsou většinou velmi evolučně konzervovány napříč celou eukaryotní říší (Chapat and Corbo 2014).

Kromě deadenylační aktivity má komplex ještě funkci ubiquitin ligázy E3. Ubiquitinace je u kvasinek i mnohobuněčných zajištěna pomocí Not4p/CNOT4 podjednotky. Konjugačním enzymem E2 jsou u kvasinky proteiny Ubc4p a Ubc5p (Albert *et al.* 2002, Chapat and Corbo 2014, Mulder *et al.* 2007). CCR4-NOT ubiquitinyluje například chromatin remodelační enzymy, v kvasince například histondemetylázu Jhd2, jejíž polyubiquitinylace vede k degradaci v proteasomu (Mersman *et al.* 2009).

CCR4 a CAF1 lokalizují do P-bodies, což ukazuje, že deadenylace jako součást 3'-5' degradační dráhy probíhá také v těchto tělíscích (Chapat and Corbo 2014).

3.4.2 Sekvenční motivy a doménové uspořádání CCR4-NOT:

N-terminální část kvasinkového Not1 obsahuje interakční repeticce HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR), které najdeme například v transportních proteinech jako je Ran-GTP vazebný importin (Vetter *et al.* 1999). Dvě další domény vykazují homologii se střední doménou eukaryotního translačního iniciačního faktoru eIF4G – doména MIF4G-like a MIF4G. Doména MIF4G rozpoznává CAF1. CAF1 přivádí nukleázu CCR4 interakci s její doménou LRR. Takto vzniká vazebná platforma pro faktory katalyzující deadenylaci, translační represi a odstranění čepičkové struktury (Obrázek č.7) (Chen *et al.* 2014, Basquin *et al.* 2012).



(Jonas and Izaurralde 2015)

Obrázek č.7: Proteinové složení komplexu CCR4-NOT je podmíněno přítomností a uspořádáním sekvenčních domén proteinu NOT1, který se chová jako strukturní proteinové lešení komplexu. Vazbou s NOT1 se skládají tři konkrétní moduly – modul NOT10-NOT11, katalytický deadenylační modul a modul NOT. Domény MIF4G-like a MIF4G vykazují homologii se střední doménou eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4G. NOT1 obsahuje CAF40/NOT9-vazebnou doménu (CN9BD) a karboxy-terminální NOT1 superfamily homologní doménu (SHD). Katalytický modul proteinového komplexu se skládá z CAF1 a CCR4 (Jonas and Izaurralde 2015, Chapat and Corbo 2014).

3.4.3 Proteinové interakce komplexu CCR4-NOT a jeho role v translační represi:

Doména MIF4G podjednotky NOT1 interaguje s C-terminální doménou RecA proteinu DDX6. DDX6 funguje jako translační represor a současně jako aktivátor odštěpení čepičkové struktury. NOT1 moduluje konformaci DDX6, čímž ji přivádí do aktivní formy, stabilizuje ji a stimuluje její ATPázovou aktivitu, která, jak se ukázalo, je esenciální pro ustanovení translační represe (Mathys *et al.* 2014). Krystalová struktura komplexu MIF4G-DDX6 vykazuje podobnost s komplexem eIF4G-eIF4A a je zodpovědná za simultánní vazbu CAF1 na MIF4G a poté za rekrutování „decapping“ faktorů pomocí DDX6 (Chen *et al.* 2014).

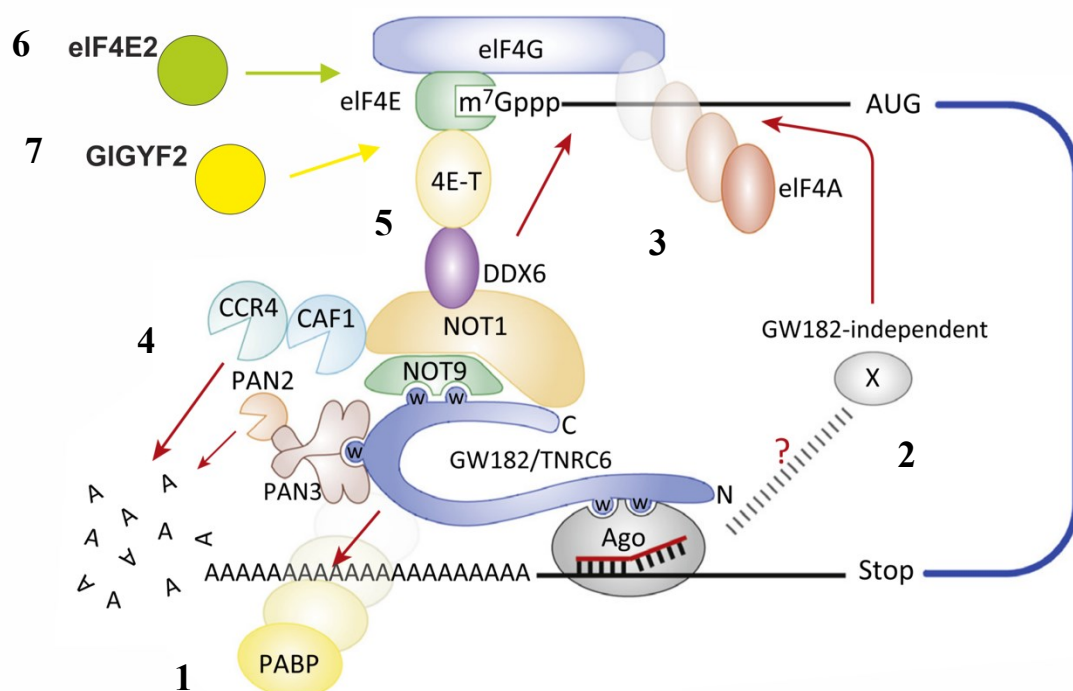
Další z důležitých proteinových interakcí CCR4-NOT je vazba na GW182. CAF40/NOT9 - vazebná doména proteinu NOT1 (CN9BD) tvoří komplex s podjednotkou NOT9 a tento komplex se pak stává primárním vazebným místem pro vazbu TNRC6A a TNRC6C pomocí glycin-tryptofanových vazebných oblastí přítomných v podjednotce NOT9 (Chen *et al.* 2014).

4 Mechanismy translační represe zprostředkované pomocí miRNA:

První takto popsanou miRNA byla lin-4 miRNA, která je komplementární k sekvenci v 3'UTR lin-14 mRNA, a která reprimuje akumulaci proteinu LIN-14. Protein LIN-14 se uplatňuje v regulaci buněčného vývojového programu *C. elegans*. Míra syntézy tohoto proteinu, polyadenylace jeho transkriptu a polysomální sedimentace zůstávaly stejné. Soudilo se tedy, že dochází k normální míře iniciace translace a inhibovány jsou až kroky následné, tj. zejména elongační fáze translace (Lee, Feinbaum and Ambros 1993, Olsen and Ambros 1999). Dále byl postulován též post-iniciační model translační represe navrhuující jako hlavní molekulární mechanismy kotranslační degradaci vznikajících proteinů, či jejich zvýšenou cytoplasmatickou degradaci nebo předčasnou terminaci translace („*ribosome drop-off*“) (Olsen and Ambros 1999, Petersen *et al.* 2006, Nottrott, Simard and Richter 2006).

Translační represe na úrovni iniciace byla prvně popsána v buněčné linii HeLa za použití reportérových mRNA, jejichž translace byla regulována miRNA let-7. Bylo pozorováno, že reprimovaná mRNA se posunují do lehčí frakce sedimentačního gradientu polysomálního profilu, což naznačuje narušení skládání ribozomů na mRNA a tedy zpomalení či narušení iniciačního kroku translace (Pillai *et al.* 2005).

Následné studie potvrdily, že k nastolení translační represe musí docházet narušením funkční čepičkové struktury. Byl vytvořen translačně kompetentní lyzát lidské buněčné linie HEK293T obsahující důležité komponenty miRNA degradační dráhy jako jsou proteiny Dicer, GW182 a AGO2. K tomuto lyzátu byla přidána reportérová mRNA FLuc-6xT nesoucí analog čepičkové struktury, ApppG. Takto modifikovaná mRNA není schopna účastnit se kanonické iniciace translace. ApppG-FLuc-6xT mRNA se ukázala být rezistentní k translační represi (Wakiyama *et al.* 2007). Stejně výsledky byly pozorovány i u *D. melanogaster*, kde reportérová mRNA exprimující světluškovou (Firefly) luciferázu nesoucí analog čepičky ApppG nebyla reprimována po vazbě s miRNA miR2 (Thermann and Hentze 2007). Další studie, která použila translačně kompetentní extrakt myších buněk Krebs-2, ukázala, že přidání purifikovaného komplexu eIF4F do lyzátu vede k čtyřnásobnému navýšení míry translace. Účinek eIF4F je specifický, neboť jiné translační iniciační faktory nebyly schopny translační represi zvrátit (Pillai *et al.* 2005, Mathonnet *et al.* 2007, Ding and Grosshans 2009). Tyto výsledky vedly k návržení modelu inhibice translace zprostředkované působením miRNA, který vychází z narušení funkce komplexu eIF4F, zejména ve spojitosti s přerušením translačně kompetentní „*closed-loop*“ formace mRNA vazbou represorových proteinů. Zobecnující mechanismus popisující jednotlivé fáze ustanovení translační represe vycházející z přesného popisu proteinových interakcí však navržen dosud nebyl. V následující části práce přináším dosud popsané mechanismy, snažím se mezi nimi nalézt propojení a rozšířit je o nejnovější publikované informace (Obrázek č. 8).



Upraveno podle: (Iwakawa and Tomari 2015)

Obrázek č. 8: Univerzální schéma translační represe s jednotlivými dosud navrženými mechanismy.

První kroky k ustanovení translační represe a následnému nasměrování molekuly mRNA do degradační dráhy lze popsat následovně: miRISC pomocí miRNA vyhledá cílové místo na molekule mRNA, protein AGO váže pomocí glycin-tryptofanového vazebného místa protein GW182 (u člověka TNRC6A-C), dále tryptofanové zbytky GW182 váží další proteiny s glycin-tryptofanovými vazebnými místy, tj. podjednotku PAN3 deadenylačního komplexu PAN2-PAN3 a podjednotku NOT9 komplexu CCR4-NOT.

Nyní přichází na řadu několik možných mechanismů zprostředkování translační represe:

1. Odstranění proteinu PABP z mRNA pomocí GW182 s následným narušením cirkularizace mRNA.
2. Translační represe zprostředkovaná nezávisle na GW182.
3. miRNA-zprostředkované odstranění nebo navázání helikáz eIF4A1 či eIF4A2.
4. Translační represe navozená deadenylázami (CAF1 a CCR4).
5. 4E-T-zprostředkovaná represe, interakce 4E-T s eIF4E2.
6. eIF4E2-zprostředkovaná represe.
7. GIGYF2-zprostředkovaná represe, interakce GIGYF2 s eIF4E2.

4.1 Odstranění proteinu PABP zprostředkované pomocí proteinu GW182

Specificky navozenou disociací proteinu PABP dochází k narušení „*closed-loop*“ formace mRNA. Linearizace molekuly vede k zastavení aktivní translace a mRNA se stává přístupná k vazbě s proteiny navozujícími translační represi a také k interakci s deadenylačními proteinovými komplexy.

K interakci GW182 a PABP dochází přes vysoce konzervovanou doménu PABC proteinu PABP a motiv PAM2 proteinu GW182 (Kozlov *et al.* 2010, Huntzinger *et al.* 2010).

Bylo dokázáno, že protein PABP má v umlčování duální roli. Podněcuje asociaci miRISC s cílovou mRNA a tím stimuluje „*silencing*“ a po vazbě miRISC specificky disociuje, čímž stimuluje deadenylaci (Moretti *et al.* 2012). Dojde tak k odhalení polyadenylovaného konce, který se stává snadněji dostupný deadenylázám. PABP má roli v udržování a chránění poly(A) konce. K rekrutování deadenyláz nepřispívá, protože efektivní deadenylace může být zprostředkována i na reportérové polyadenylované mRNA po vyřazení funkce PABP (Fukaya and Tomari 2011).

Deadenylázy jsou rekrutovány na mRNA pomocí proteinu GW182, který sám inhibuje translaci i bez navázání deadenyláz. Deadenylační komplex CCR4-NOT je specificky rekrutován pomocí motivů CIM-1 a CIM-2 proteinu GW182 a přispívá k disociaci PABP z mRNA s následkem ztráty její cirkularizace. Pokusy s jednotlivými podjednotkami komplexu CCR4-NOT odhalily, že za disociaci PABP je zodpovědná podjednotka NOT1 (Zekri, Kuzuoglu-Ozturk and Izaurralde 2013).

PABP se ukázal být neesenciální pro efektivní inhibici aktivní translace. Byl vytvořen translačně kompetentní lyzát S2 buněk *D.melanogaster* obsahující reportérové mRNA kódující *Renilla* luciferázu konstruované s osmi cílovými místy pro let-7 miRNA a 114nt dlouhým poly(A) koncem. Tyto reportérové mRNA byly účinně reprimovány za přítomnosti PABP i po blokování PABP pomocí GST-PAIP2 (Fukaya and Tomari 2011). PAIP2 (PABP-interacting protein 2) je translační represor, který váže PABP a podněcuje disociaci PABP podobně jako GW182 (Khaleghpour *et al.* 2001). Interakce GW182-PABP je přidáním PAIP2 též narušena, to se shoduje s tím, že PAIP2 i GW182 obsahují PABP-vazebný motiv PAM2 (Fukaya and Tomari 2011).

Bylo také dokázáno, že protein GW182, či jeho části mají samy o sobě umlčovací schopnost. Nepolyadenylované reportérové mRNA bez možnosti vázat PABP byly efektivně reprimovány po přidání miRNA, GW182, nebo jeho podjednotek. Každá ze třech testovaných variant byla schopna reprimovat translaci mRNA bez ohledu na přítomnost poly(A) konce (Eulalio *et al.* 2009b, Chekulaeva, Filipowicz and Parker 2009, Zekri *et al.* 2013, Pillai *et al.* 2005). C-terminální fragment proteinu TNRC6C (lidský GW182) vykazoval silnější efekt ve srovnání s nemodifikovaným proteinem. Proteinový fragment nazvaný autory jako N1370 fungoval jako autonomní represní proteinová doména, a to i bez potřeby interakce s AGO nebo TNRC6. Navíc

bylo zjištěno, že glycin-tryptofanové a glutamin-bohaté sekvence GW182 také mají určitou schopnost reprimovat translaci (Zipprich *et al.* 2009).

Shrnutím těchto výzkumů je fakt, že odstranění proteinu PABP je prvním krokem k nastolení translační represe. PABP nemá represní funkci a není ani mediátorem rekrutování deadenyláz. Protein GW182 či jeho části mohou zprostředkovat „*silencing*“ samy, nezávisle na uvolnění PABP z mRNA, či nezávisle na jiných proteinových hráčích. Každopádně GW182 je mediátorem kroků, které vedou k odhalení poly(A) konce mRNA a tedy aktivním koaktivátorem deadenylace jako takové. Deadenylace je podle těchto výsledků přímým efektem působení miRNA a nastupuje okamžitě po ustanovení translační inhibice zprostředkované proteinem GW182 či současně s ní.

4.2 Translační represe nezávislá na proteinu GW182

Protein GW182 aktivuje proces deadenylace, samotná translační represe ale může být zprostředkována i nezávisle na tomto proteinu.

V bezbuněčném translačně kompetentním lyzátu S2 buněk *D. melanogaster* došlo k cílenému odstranění proteinu GW182, což se projevilo inhibicí miRNA-zprostředkované deadenylace. Nezávisle na GW182 se AGO1-RISC projevil dostačující k translační represí. Deadenylační komplexy PAN2-PAN3 nebo CCR4-NOT pro translační represí nezávislou na GW182 potřebné nebyly. Dále bylo potvrzeno, že AGO1-RISC v tomto případě blokuje iniciační krok translace, konkrétně krok závislý na aktivaci helikázy eIF4A. Translační represe byla ale přesto efektivnější v přítomnosti GW182 (Fukaya and Tomari 2012).

Naopak, translační represe byla narušena přidáním N-terminálního fragmentu GW182 vázajícího Ago1-RISC. Jak ale může být GW182-nezávislá dráha ovlivněna tímto proteinem? Autoři článku přicházejí s možnými vysvětleními. Podle nich je jednou z možností existence zbytkového množství proteinu GW182 i po jeho „*knock-downu*“ pomocí RNA interference, které bylo pro ustanovení translační represe dostačující. Tato hypotéza se i samotným autorům nezdála býti pravděpodobná, neboť transfekce siRNA proti GW182 vedla ke kompletnímu bloku deadenylace. Další možností, kterou navrhli, je přítomnost dalšího, dosud neznámého proteinu, který obsahuje glycin-tryptofanové zbytky podobně jako protein GW182, a může být též mediátorem translační represe. Ago1-RISC v tomto modelu inhibuje translaci navázáním tohoto neznámého proteinu. N-terminální fragment GW182 pak kompetuje o vazbu s tímto dosud neznámým mediátorem translační represe (Fukaya and Tomari 2012).

Zda GW182-nezávislé dráhy existují i u člověka, zůstává stále předmětem výzkumu.

4.3 miRNA-zprostředkované odstranění nebo navázání helikáz eIF4A1 a eIF4A2

V současné době je upřednostňován mechanismus translační represe, pro který je nutná přítomnost 7^mG čepičky na studovaných mRNA. U transkriptů opatřených na svém 5' konci čepičkovou strukturou se zdají být cílem regulace a ustavení translační represe eukaryotní translační iniciační faktory komplexu eIF4F.

Jedním z navržených způsobů regulace je odstranění eIF4A, což je RNA helikáza proteinové rodiny DEAD box, která rozvolňuje sekundární struktury mRNA v jejich 5' nepřekládaných oblastech. Jako součást komplexu eIF4F se uplatňuje v procesu skenování a nalezení iniciačního kodónu.

Vazba miRNA na mRNA způsobuje rozpad komplexu eIF4F během iniciace translace. V bezbuněčném translačně kompetentním lyzátu buněk *D. melanogaster* připraveném z reportérové mRNA a let-7 miRNA bylo zjištěno, že ektopická nadexprese „His-tagovaných“ forem proteinů eIF4E a eIF4A ovlivňuje disociaci eIF4A z eIF4F komplexu indukovanou pomocí Ago1-RISC. Zatímco zvýšení množství eIF4E neovlivnilo uvolnění helikázy z komplexu, přebytek eIF4A v buněčném extraktu suprimoval disociaci eIF4A z eIF4F. Z uvedeného plyne, že samotné rozpoznání čepičky ovlivněno nebylo a že molekulárním terčem pro ustanovení translační represe jsou až kroky následné v procesu iniciace translace (Fukaya, Iwakawa and Tomari 2014).

Protein GW182 sám disociaci eIF4A nezprostředkovává, protože razantní snížení množství GW182 nezvrátilo translační represi ani disociaci eIF4A ustanovenou pomocí Ago1-RISC. Absence GW182 způsobila u reportérové mRNA zablokování deadenylace. Represe pomocí Ago1-RISC může být tedy provedena i bez účasti proteinu GW182, avšak přítomnost GW182 nebo miRNA indukovala uvolnění jak eIF4E, tak eIF4A z reportérové mRNA s následným zablokováním iniciace translace. V této studii se protein PABP projevil jako postradatelný pro umlčování, neboť nepolyadenylovaná forma reportérové mRNA byla translačně reprimována, ačkoli méně výrazně než její polyadenylovaný protějšek (Fukaya *et al.* 2014).

eIF4A je kódováno u savců dvěma geny – eIF4A1 a eIF4A2. miRISC u savců způsobuje disociaci obou příslušejících proteinů z cílové mRNA, a to ještě před disociací PABP nebo uvolněním eIF4E a eIF4G z mRNA s následným narušením „closed-loop“ formace. I toto pozorování svědčí o tom, že k efektivní disociaci eIF4A není třeba GW182 (Fukaya *et al.* 2014). Aminokyselinová sekvence obou izoform eIF4A je shodná asi z 90 %, přičemž hlavní rozdíly v sekvenci se nacházejí v N-terminální doméně. Obě izoformy jsou schopny vytvářet funkční eIF4F komplex. Jejich zaměnitelnost dokazuje i fakt, že obě vykazovaly středně silný stimulační efekt na efektivitu translace závislé na čepičkové struktuře (Pestova, Shatsky and Hellen 1996, Fukao *et al.* 2014).

Jiná studie naopak uvádí, že eIF4A2 má spíše represivní efekt na translaci reportérových mRNA se strukturovanými 5'UTR. Bylo zjištěno, že eIF4A2 interaguje s proteinovým komplexem

CCR4-NOT a to pomocí domény MIF4G proteinu NOT1. MIF4G doména není schopna vázat eIF4A1, ale její interakce s eIF4A2 je analogická vazbě eIF4G-eIF4A v komplexu eIF4F. Na rozdíl od něho však vede k translační represi u studované mRNA (Meijer *et al.* 2013).

Další práce dokázala, že doména MIF4G váže RNA helikázu DDX6, což je v rozporu s výše popsaným pozorováním interakce NOT1 a eIF4A2 (Chen *et al.* 2014). Výlučná interakce eIF4A2 s doménou MIF4G byla podpořena i další studií, která dokázala, že vazba eIF4A1 k doméně MIF4G je elektrostaticky nevýhodná (Mathys *et al.* 2014). Na druhou stranu, protein-proteinová interakce domény MIF4G s DDX6 byla potvrzena koimunoprecipitací GST- značených proteinových variant CNOT1 s DDX6 „tagovaným“ proteinovou kotvou MBP v HEK293T buněčných lyzátech ošetřených RNázou A (Rouya *et al.* 2014). Současně bylo ukázáno, že pravděpodobně dochází k vazbě CAF1 na doménu MIF4G a následnému rekrutování „decapping“ proteinových faktorů pomocí DDX6 (Chen *et al.* 2014, Mathys *et al.* 2014, Rouya *et al.* 2014). Zde navržené modely se tedy rozcházejí v otázce, zda je eIF4A2 rekrutován nebo eIF4A1 uvolněn z translačního iniciačního komplexu. Zdá se, že dostupná literatura spíše preferuje uvolnění eIF4A1 a následné rekrutování deadenylačních komplexů jako pravděpodobnější možnost.

4.4 Rekrutování translačních inhibitorů na mRNA

4.4.1 CAF1

GW182 by mohl kromě cíleného odstranění PABP z mRNA pomocí své interakce s CCR4-NOT ještě vázat další proteiny vykazující inhibiční efekt na translaci studované mRNA. Další možností je, že samotné proteiny v CCR4-NOT samy o sobě vykazují aktivitu translačních represorů.

Bylo pozorováno, že vazba CAF1 může indukovat translační represi cílové mRNA (Chekulaeva *et al.* 2011, Braun *et al.* 2011). Také další aktivní deadenyláza CCR4 byla navržena jako represor (Cooke, Prigge and Wickens 2010). CAF1 a CCR4 k polyadenylované reportérové luciferázové mRNA vedlo na výzkumu u oocytů drápatky ke snížení proteinového produktu 3-4x. CAF1 indukoval snížení proteinového produktu 2-3x i na nepolyadenylovaných konstruktech (Cooke, Prigge and Wickens 2010).

V další studii mutant CAF1 neschopný interakce s CNOT1 nebo CCR4 nevedl k žádné translační represi. Naopak *wild-type* CAF1 reprimoval aktivitu polyadenylovaného i nepolyadenylovaného mRNA reportéru. CAF1 podle těchto výsledků není translačním inhibitorem, ale rekrutuje CNOT1, pravděpodobně ještě kontaktem s DDX6 (Mathys *et al.* 2014).

4.4.2 4E-T

K rekrutování proteinu 4E-T na mRNA dochází nejspíše pomocí helikázy DDX6. Současně s vazbou 4E-T dokáže DDX6 interagovat také s podjednotkou CNOT1 komplexu CCR4-NOT. 4E-T podle výsledků této skupiny kontaktuje CNOT1, zprostředkovaně, prostorovou vazbou mezi 4E-T a DDX6 (Ozgur *et al.* 2015).

4E-T (eIF4E-transporter) je protein o délce 985aa, který vykazuje především cytoplazmickou buněčnou lokalizaci. Jeho funkce spočívá ve zprostředkování importu eIF4E do jádra (ve vazbě s importinem $\alpha\beta$). K eIF4E se váže pomocí krátkého eIF4E-vazebného motivu ve své N-terminální části ($Y^{30}X_4LL$), čímž vytěsňuje faktor eIF4G, rozeznávající stejný sekvenční motiv. Následkem interakce eIF4E s 4E-T je inhibice iniciace translace (Dostie *et al.* 2000, Ferraiuolo *et al.* 2005, Kamenska *et al.* 2014).

4E-T také vtahuje eIF4E do P-bodies. K této interakci je vyžadována kromě eIF4E-vazebného motivu $Y^{30}X_4LL$ také část sekvence C-terminální oblasti počínaje aminokyselinovým zbytkem č. 694 (Kamenska *et al.* 2014).

Snížení množství 4E-T v buňce stabilizuje mRNA, která by jinak směřovala do miRNA-indukované RNA degradační dráhy. Cytoplazmatická stabilizace těchto mRNA je demonstrována blokováním zkracování poly(A) konce, což nepřímo poukazuje na funkci 4E-T v nastolení translační represe (Nishimura *et al.* 2015).

Byly navrženy dva mechanismy, jakými by 4E-T mohl zprostředkovat inhibici iniciace translace, či k ní přispívat. První podporuje represní aktivitu samotného 4E-T. Bylo totiž pozorováno, že 4E-T nezávisle na přítomnosti eIF4E reprimuje expresi reportérových mRNA *in vitro*. Druhý mechanismus je založen na zjištění, že 4E-T má vliv na snížení eIF4E-závislé proteosyntézy a to tím, že vyvazuje eIF4E dostupný pro translační iniciační komplex (Kamenska *et al.* 2014). Konkrétní kroky tohoto procesu a konkrétní molekulární interakce bohužel dosud popsány nebyly.

Recentně však byla zdůrazněna role interakce 4E-T a eIF4E2. Vazba 4E-T a eIF4E2 je též zprostředkována pomocí eIF4E-vazebné konsenzus sekvence $Y^{30}X_4LL$, autoři ale popisují další přídatnou sekvenci $Y^{55}X_4VW$ proteinu 4E-T (Kubacka *et al.* 2013). Ačkoli tato sekvence váže i eIF4E1, bylo potvrzeno, že má roli ve zvýšení afinity eIF4E2 k čepičkové struktuře (Chapat *et al.* 2017).

4.4.3 eIF4E2 (4EHP)

Významným proteinem, který se podílí na miRNA-zprostředkované translační represi, je eIF4E2. Ve starší literatuře bývá také označován jako 4EHP (eIF4E-homologous protein) či 4E-LP (eIF4E-like protein).

U eukaryot, zejména pak u živočichů, existuje velké množství paralogických genů eIF4E, které kódují tzv. „eIF4E-like“ proteiny. Role těchto evolučně odvozených proteinů není v některých případech přesně určena, ale obecně lze říci, že fungují jako translační faktory zajišťující transkript-specifickou translaci během různých fyziologických stavů, ve stresových podmínkách (např. hypoxie) nebo během určitých vývojových stádií. Další dobře popsanou funkcí některých proteinových zástupců je inhibice iniciace translace, právě díky jejich podobnosti k *bona fide* eIF4E. U savců existují tři zástupci proteinové rodiny eIF4E, eIF4E1 (kanonický 4E translační iniciační faktor), eIF4E2 a eIF4E3; tito zástupci se liší sekvenčně, strukturně, ale hlavně funkčně, s tím, že právě eIF4E2 má bezprostřední vztah k procesu translační represe.

Tento protein je dlouhý 245 aminokyselin a exprimuje se ve všech savčích tkáních. Stejně jako eIF4E1 se váže na čepičkovou strukturu, což bylo nezávisle potvrzeno v lidských i myších buňkách (Joshi, Cameron and Jagus 2004, Rom *et al.* 1998).

eIF4E2 vykazuje jen 28% sekvenční identity s eIF4E1, přičemž jeho terciární struktura je ale eIF4E1 velmi podobná (Joshi *et al.* 2004, Rom *et al.* 1998).

eIF4E2 váže čepičkovou strukturu a analogy čepičky s 30 – 100x nižší afinitou než eIF4E1. Navíc se v buňce nachází v 5 – 10x menším množství než eIF4E1. Z toho vyplývá, že eIF4E2 není za fyziologických podmínek schopen kompetovat s eIF4E1 o vazbu na čepičku (Zuberek *et al.* 2007, Rom *et al.* 1998). Tato situace se však mění po navázání dalších interakčních partnerů, které mohou způsobit zvýšení vazebné afinity.

Na tomto principu dochází například k ustavení anterior-posteriorní osy embrya a správnému asymetrickému rozložení množství proteinů Caudal a Hunchback u *D. melanogaster*. Pro efektivní translační represi caudal i hunchback mRNA je vyžadován protein eIF4E2. V případě caudal mRNA protein eIF4E2 specificky interaguje s proteinem Bicoid (Cho *et al.* 2005, Cho *et al.* 2006). Podobně u myši nastává translační represe některých mRNA během raného embryonálního vývoje. Myší homeobox protein Prep1 interaguje s eIF4E2 a reprimuje tak translaci Hoxb4 mRNA (Villaescusa *et al.* 2009). Tristetraprolin (TTP), který rekrutuje eIF4E2, reprimuje translaci mRNA obsahujících ARE elementy (AU-bohaté sekvenční elementy) (Fu *et al.* 2016). Podobný účinek na translaci lze pozorovat také po vazbě proteinu GIGYF2 na eIF4E2 (Morita *et al.* 2012).

Za snížením vazebné afinity k čepičkové struktuře u eIF4E2 stojí substituce čepičku-vázajících aminokyselin, Trp43 a Trp56 (u eIF4E1) za tyrosiny. eIF4E2 navíc neinteraguje s eIF4G, čímž zamezuje vytvoření „closed-loop“ formace aktivně translatujících mRNA. Tyto dvě vlastnosti

předurčují eIF4E2, aby fungoval jako inhibitor v procesu iniciace translace (Joshi *et al.* 2004, Rom *et al.* 1998).

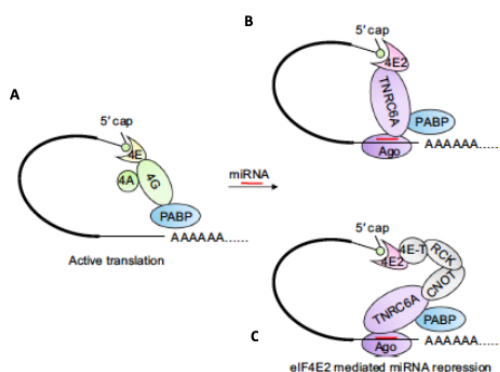
Represní role eIF4E2 byla skutečně potvrzena v recentních publikacích. Pro zhodnocení role proteinu eIF4E2 v tomto procesu byly vytvořeny dvě shRNA komplementární k dvěma různým místům mRNA genu eIF4E2 s cílem zamezení jeho exprese. Aktivita luciferázy reportérové LRE mRNA nesoucí let7a místa potom poklesla 8x. Exprese mutantní formy eIF4E2 neschopné vázat čepičku (W126A) v podmínkách současné deplece endogenního eIF4E2 vedla pouze k dvounásobnému snížení aktivity luciferázy. V dalším pokusu byl použit reportér 19RE s cílovými místy pro miRNA miR-19. Mutantní forma eIF4E2 snížila expresi luciferázy z reportérové mRNA 19RE pouze 6x, zatímco přirozená forma eIF4E2 inhibovala translaci 12x oproti změřené aktivitě luciferázy exprimované z kontrolní reportérové mRNA.

V HeLa buňkách exprimujících miRNA let-7a byl pozorován vliv TNRC6A/B (GW182) a eIF4E2 na expresi proteinu IMP1. Bylo měřeno množství tohoto proteinu v závislosti na množství proteinů TNRC6A a B a eIF4E2 v buňce. Transfekce specifickými siRNA proti TNRC6A a B a eIF4E2 docílila razantní snížení až vymizení těchto proteinů v testovaných buňkách. Deplece TNRC6A zvýšila hladinu IMP1 proteinu 3x, eIF4E2 pak 6x. Pomocí koimunoprecipitací bylo dále popsáno, že protein TNRC6A přímo interaguje s eIF4E2 svou C-terminální doménou. Autoři tedy navrhuji mechanismus, kde TNRC6A přímo rekrutuje eIF4E2 na mRNA a způsobuje její translační represi (Obrázek č. 9B) (Chen and Gao 2017).

Ve stejné době byl publikován článek, který nabízí ještě další možný mechanismus, kde eIF4E2 hraje také klíčovou roli v umlčení translace. Autoři navrhuji, že miRNA přivádí eIF4E2 na mRNA pomocí interakčního komplexu CNOT1– RCK(DDX6) – 4E-T (Obrázek č.9C) (Chapat *et al.* 2017). CNOT1 váže DDX6, vazebného partnera 4E-T. 4E-T také kontaktuje CNOT1 (Ozgur *et al.* 2015). 4E-T je dobře charakterizovaný eIF4E-vazebný protein. Bylo potvrzeno, že eIF4E2 kompetuje s eIF4E1 o vazbu na 4E-T, přičemž afinita 4E-T k eIF4E2 je 20-30x vyšší než k eIF4E1. Dále interakce eIF4E2 a 4E-T zvyšuje asi 4x jeho afinitu k čepičkové struktuře (Chapat *et al.* 2017).

Ačkoli 4E-T zvyšuje vazebnou afinitu eIF4E2 k čepičce signifikantně, stále je tato vazebná afinita velmi slabá ve srovnání s eIF4E1. Autoři vysvětlují tento rozpor tím, že interakce 4E-T a eIF4E2 zvyšuje lokální koncentraci proteinu eIF4E2 v okolí čepičky, čímž dochází k vytěsnění eIF4E1 z vazby na mRNA a následnému ustanovení translační represe (Chapat *et al.* 2017).

Možné je, že oba recentně navržené mechanismy se vzájemně doplňují a dochází ke komplexním prostorovým proteinovým interakcím.



Upraveno podle: (Chen and Gao 2017)

Obrázek č.9: Recentní navržené modely translační represe zprostředkované eIF4E2.

A. Uspořádání molekuly mRNA a navázané proteiny během iniciace translace.

B. Přes přímou interakci C-terminální domény TNRC6A je rekrutován protein eIF4E2. Jde o model navržený v publikaci Chen and Gao 2017.

C. V modelu navrženém v publikaci Chapat *et al.* 2017 je eIF4E2 rekrutován komplexem CNOT-RCK(DDX6)-4E-T. eIF4E2 kompetuje s eIF4E1 o vazbu 4E-T.

4.4.4 GIGYF2

Grb10 - interagující GYF protein 2 (GIGYF2) byl poprvé popsán za použití kvasinkového dvouhybridního systému. Jde o protein, který svou doménou GYF bohatou na glycin, tyrosin a fenylalanin interaguje s N-terminální oblastí proteinu Grb10, která je bohatá na prolin. Grb10 se váže k intracelulárním doménám aktivovaných tyrosin kinázových receptorů, včetně insulin-like růstového faktoru (IGF-I) a insulinového receptoru. Grb10 slouží jako adaptorový protein, který přechodně váže GIGYF2 (Giovannone *et al.* 2003). Některé varianty GIGYF2 se vztahují k etiologii Parkinsonovy choroby – současné publikace ale dávají zcela odlišné výsledky (Zhang *et al.* 2015).

Recentní pokusy dokázaly, že GIGYF2 funguje jako translační represor, který přímo interaguje s eIF4E2. GIGYF2 vytváří přemostění mezi 3'UTR RNA vazebnými proteiny jako je tristetraprolin (TTP) a proteinem eIF4E2, který váže 5' konec mRNA. Obrázek č.10B ukazuje, jak se tímto mRNA spojuje do kruhové struktury, která ale není translačně kompetentní (Morita *et al.* 2012).

Vzájemný funkční vztah mezi eIF4E2 a proteinem GIGYF2 byl demonstrován pokusem, kde došlo k narušení jejich interakce v myším modelu, což vedlo ke zvýšení celkové translace a perinatální úmrtnosti. Abundance a stabilita obou těchto proteinů jsou nejspíše vzájemně koregulované – deplece eIF4E2 vedla ke snížení množství GIGYF2 a naopak (Morita *et al.* 2012).

Byla též popsána interakce GIGYF2 s komponenty důležitými k „*silencingu*“. Svou GYF doménou GIGYF2 interaguje s AGO2 (Kryszke *et al.* 2016, Ramirez *et al.* 2018). TNRC6C (lidský GW182) přímo interaguje s GYF doménou svým aminokyselinovým motivem PPGL. Dále bylo pozorováno, že GIGYF2 pozitivně reguluje aktivitu miRISC v počátečních fázích „*silencingu*“, ačkoli zesílení mRNA degradace zaznamenáno nebylo (Schopp *et al.* 2017). Byla popsána též interakce DDX6 s N-terminální doménou GIGYF2 (Ramirez *et al.* 2018).

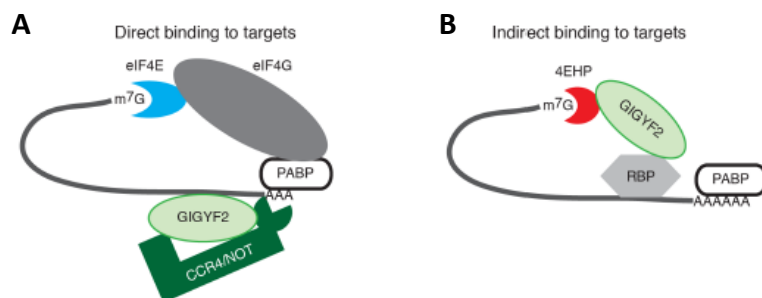
GYF doména kvasinkového proteinu Smy2 se stala modelem pro zkoumání eukaryotního GIGYF2 a to z důvodu, že hraje též roli v kontrole translace u kvasinek, má stejnou terciární strukturu a vykazuje stejnou vazebnou specifitu jako GYF doména GIGYF2. Smy2 váže ligandy bohaté na prolin označované jako PRS (proline-rich sequences). Tímto způsobem byla popsána interakce kvasinkového Smy2 s CCR4-NOT komplexem (Ash *et al.* 2010). Později byla popsána i interakce CCR4-NOT s GIGYF2. HA-značený GIGYF2 asocioval s podjednotkami CNOT1, CNOT7 a CNOT9, přičemž překvapivě nebyla pozorována žádná interakce s GYF doménou. S CNOT podjednotkami interagovaly pouze N-terminální i C-terminální doména GIGYF2 a uměle vytvořená varianta obsahující N-terminální a GYF doménu. Závěrem je tedy to, že interakce GIGYF2 s CCR4-NOT je zprostředkována komplexními protein-proteinovými interakcemi povrchů GIGYF2 a podjednotek NOT (Ramirez *et al.* 2018).

Translační represe zprostředkováná pomocí GIGYF2 je buďto závislá na vazbě eIF4E2 nebo nezávislá, spočívající v rekrutování CCR4-NOT, který, jak už bylo několikrát zmíněno, deadenyluje cílovou mRNA. Vazba GIGYF2 tak může nepřímo podněcovat degradaci mRNA. V pokusu s odstraněním N-terminální domény GIGYF2, která obsahuje eIF4E-vazebný motiv, bylo potvrzeno, že k translační represí zprostředkované GIGYF2 dochází nezávisle na eIF4E2. Bylo též navrženo, že GIGYF2-zprostředkováná represe vyžaduje vazbu CCR4-NOT (Obrázek č. 10A). Absence CNOT1, CNOT7 a CNOT8 v komplexu CCR4-NOT vedla ke kompletnímu zvratu GIGYF2-zprostředkované translační represe (Ramirez *et al.* 2018).

Druhou variantou je, že GIGYF2 pro zprostředkování translační represe vyžaduje interakci s eIF4E2. GIGYF2 se váže selektivně na eIF4E2, nikoli na eIF4E1. Interakce GIGYF2 a eIF4E2 se odehrává skrze kanonický eIF4E-vazebný motiv nacházející se v N-terminální části proteinu GIGYF2. Vzhledem k tomu, že tento motiv se nalézá také v proteinech eIF4G, 4E-T nebo 4E-BP, je síla vazby GIGYF2 k eIF4E2 zvýšena pomocí přídatných sekvencí. Tyto přídatné sekvence interagují s argininy v pozicích 103 a 140 a glutamovou kyselinou v pozici 149 proteinu eIF4E2 a zvyšují afinitu GIGYF2 k eIF4E2, čímž zajišťují vytvoření funkčního komplexu *in vivo* (Peter *et al.* 2017).

Jak už bylo zmíněno, stejné vazebné místo v proteinu eIF4E2 využívá kromě GIGYF2 i 4E-T. Vzhledem k tomuto faktu se dá předpokládat, že tyto proteiny musí o vazbu kompetovat (Chapat *et al.* 2017). Jak ale dochází k přesné interakci mezi eIF4E2 a GIGYF2 / 4E-T a jestli spolu proteiny opravdu interagují, je stále předmětem výzkumu.

Jako součást komplexu eIF4E2-GIGYF2 byl popsán „*zinc-finger*“ protein ZNF598 (Morita *et al.* 2012). Vzhledem k tomu, že se jedná o RNA-vazebný protein, nebylo překvapivé zjištění, že jeho úloha spočívá ve vyhledání cílových mRNA. ZNF598 podobně jako tristetraprolin (TPP) obsahuje sekvenční oblasti bohaté na prolin stejně jako doména GYF proteinu GIGYF2. Bylo tedy navrženo schéma proteinových interakcí, kde eIF4E2 váže protein GIGYF2, na který nasedá ZNF598. RNA-vazebná specifita ZNF598 byla potvrzena purifikací RNA pomocí GFP-značeného ZNF598. Ukázalo se však, že ZNF598 se váže jak na mRNA, tak i rRNA. Některé nabohacené mRNA v této purifikaci kódovaly mediátory signalizování zánětlivé odpovědi, dá se tak předpokládat, že komplex eIF4E2– GIGYF2– ZNF598 může hrát regulační úlohu v tomto procesu (Tollenaere *et al.* 2019).



Upraveno podle (Ramirez *et al.* 2018)

Obrázek č.10: Modely možné funkce proteinu GIGYF2 v nastolení translační represe.

A. Přímá interakce s proteinovým komplexem CCR4-NOT, která probíhá nezávisle na eIF4E2.

B. Zprostředkování nepřímé interakce vazbou mezi RBP (RNA binding proteins) a eIF4E2 (4EHP) (Ramirez *et al.* 2018).

5 Závěr:

Současné pohledy na zprostředkování translační represe se shodují na nejpravděpodobnějším mechanismu, který je založen na narušení cirkularizace molekuly mRNA během iniciace translace.

Deadenylace pomocí komplexu CCR4-NOT je souběžná s nastolením translační represe, s tím, že protein GW182 rekrutuje komplex CCR4-NOT, který způsobuje disociaci proteinu PABP a narušení „*closed-loop*“ formace mRNA. CCR4-NOT váže translační represor DDX6, ten je též schopen vazby na 4E-T. DDX6 též rekrutuje enzymy důležité k odstranění čepičkové struktury.

Recentně byla zdůrazněna role represorových proteinů. Vazba 4E-T na eIF4E2 zvyšuje afinitu eIF4E2 k čepičkové struktuře a lokálně zvyšuje počet dostupných molekul eIF4E2, které jsou schopny vytěsnit eIF4E1 z čepičky. eIF4E2 interaguje s proteinem GIGYF2, jenž se váže na stejný motiv eIF4E2 jako 4E-T; dá se předpokládat, že kompetují o vazbu na eIF4E2. Jak u GIGYF2, tak u 4E-T byla popsána nezávislá úloha ve zprostředkování translační represe.

V souhrnu publikované výsledky naznačují, že translační represe je zprostředkována souhrou několika výše zmíněných mechanismů, tj. vyhledáním cílové mRNA pomocí miRISC, narušením „*closed-loop*“ formace pomocí disociace PABP za účasti GW182 a CCR4-NOT, souběžnou deadenylací zprostředkovanou nejprve pomocí PAN2-PAN3 a poté CCR4-NOT a asociací dalších translačních represorů, které zabraňují komplexu eIF4F iniciovat translaci.

Přes všechny dostupné informace je stále mnoho věcí neobjasněno. Předpokládám, že v nativním mašinerii translační represe dochází k dalším, dosud nepopsaným, komplexním proteinovým interakcím. Získáváme tak pouze současný vhled do problému, který sestává z identifikace základního popisu funkce dalších proteinů hrajících úlohu v tomto procesu. Velké úsilí se tak klade na charakterizaci jejich vazebných míst s cílem lépe popsat konkrétní interakce těchto proteinů, na nichž je postaven přesný, místně a časově regulovaný sled událostí vedoucích k translační represí. Největším pokrokem v tomto ohledu jsou recentní poznatky o funkci proteinu eIF4E2 a jeho dalších proteinových partnerů s nezávislým, či závislým účinkem na ustanovení stavu, kdy je molekula mRNA translačně reprimována. Ohledně posledně řečeného musím zmínit recentní výzkum úlohy GIGYF2 v tomto procesu.

Nakonec bych chtěla shrnout obsah této práce, který si na začátku jejího sepisování kladl za cíl popsat univerzální mechanismus miRNA-zprostředkované translační represe krátkým závěrem, který stále musí podotknout, že přes četné výzkumy v této oblasti zůstávají mnohé základní otázky nedokonale zodpovězeny.

Seznam literatury:

*sekundární zdroj

- Albert, T. K., H. Hanzawa, Y. I. A. Legtenberg, M. J. de Ruwe, F. A. J. van den Heuvel, M. A. Collart, R. Boelens & H. T. M. Timmers (2002) Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *Embo Journal*, 21, 355-364.
- Arribas-Layton, M., D. H. Wu, J. Lykke-Andersen & H. W. Song (2013) Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 1829, 580-589.
- Ash, M. R., K. Faelber, D. Kosslick, G. I. Albert, Y. Roske, M. Kofler, M. Schuemann, E. Krause & C. Freund (2010) Conserved beta-Hairpin Recognition by the GYF Domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA Surveillance and Vesicular Transport Complexes. *Structure*, 18, 944-954.
- Basquin, J., V. V. Roudko, M. Rode, C. Basquin, B. Seraphin & E. Conti (2012) Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: the Not1-Caf1-Ccr4 Interaction. *Molecular Cell*, 48, 207-218.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork & E. Izaurralde (2006) MRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4 : NOT deadenylase and DCP1 : DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20, 1885-1898.
- Berset, C., A. Zurbriggen, S. Djafarzadeh, M. Altmann & H. Trachsel (2003) RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, 9, 871-880.
- Boeck, R., S. Tarun, M. Rieger, J. A. Deardorff, S. MullerAuer & A. B. Sachs (1996) The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 432-438.
- Braun, J. E., E. Huntzinger, M. Fauser & E. Izaurralde (2011) GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylase Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*, 44, 120-133.
- Brown, C. E., S. Z. Tarun, R. Boeck & A. B. Sachs (1996) PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 5744-5753.
- *Bushati, N. & S. M. Cohen. 2007. MicroRNA functions. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 175-205. Palo Alto: Annual Reviews.
- *Chapat, C. & L. Corbo (2014) Novel roles of the CCR4-NOT complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna*, 5, 883-901.
- Chapat, C., S. M. Jafarnejad, E. Matta-Camacho, G. G. Hesketh, I. A. Gelbart, J. Attig, C. G. Gkogkas, T. Alain, N. Stern-Ginossar, M. R. Fabian, A. C. Gingras, T. F. Duchaine & N. Sonenberg (2017) Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 5425-5430.
- Chekulaeva, M., W. Filipowicz & R. Parker (2009) Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *Rna*, 15, 794-803.
- Chekulaeva, M., H. Mathys, J. T. Zipprich, J. Attig, M. Colic, R. Parker & W. Filipowicz (2011) miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 1218-1226.
- Chen, S. H. & G. X. Gao (2017) MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein & Cell*, 8, 750-761.
- Chen, Y., A. Boland, D. Kuzuoglu-Ozturk, P. Bawankar, B. Loh, C. T. Chang, O. Weichenrieder & E. Izaurralde (2014) A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. *Molecular Cell*, 54, 737-750.
- Cho, P. F., C. Gamberi, Y. A. Cho-Park, I. B. Cho-Park, P. Lasko & N. Sonenberg (2006) Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Current Biology*, 16, 2035-2041.

- Cho, P. F., F. Poulin, Y. A. Cho-Park, I. B. Cho-Park, J. D. Chicoine, P. Lasko & N. Sonenberg (2005) A new paradigm for translational control: Inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 121, 411-423.
- Christie, M., A. Boland, E. Huntzinger, O. Weichenrieder & E. Izaurralde (2013) Structure of the PAN3 Pseudokinase Reveals the Basis for Interactions with the PAN2 Deadenylation and the GW182 Proteins. *Molecular Cell*, 51, 360-373.
- Cooke, A., A. Prigge & M. Wickens (2010) Translational Repression by Deadenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 28506-28513.
- Ding, X. C. & H. Grosshans (2009) Repression of C-elegans microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *Embo Journal*, 28, 213-222.
- Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, S. A. Adam & N. Sonenberg (2000) A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *Embo Journal*, 19, 3142-3156.
- Draper, M. P., C. Salvatore & C. L. Denis (1995) IDENTIFICATION OF A MOUSE PROTEIN WHOSE HOMOLOG IN SACCHAROMYCES-CEREVISIAE IS A COMPONENT OF THE CCR4 TRANSCRIPTIONAL REGULATORY COMPLEX. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3487-3495.
- Eulalio, A., S. Helms, C. Fritsch, M. Fauser & E. Izaurralde (2009a) A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 15, 1067-1077.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser & E. Izaurralde (2009b) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 15, 21-32.
- Eulalio, A., F. Triteschler & E. Izaurralde (2009c) The GW182 protein family in animal cells: New insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 15, 1433-1442.
- Eystathiou, T., E. K. L. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith & M. J. Fritzler (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 1338-1351.
- Fabian, M. R., M. K. Cieplak, F. Frank, M. Morita, J. Green, T. Srikumar, B. Nagar, T. Yamamoto, B. Raught, T. F. Duchaine & N. Sonenberg (2011) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 1211-1217.
- *Fabian, M. R., N. Sonenberg & W. Filipowicz. 2010. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. In *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79, eds. R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman & J. W. Thorner, 351-379. Palo Alto: Annual Reviews.
- Ferraiuolo, M. A., S. Basak, J. Dostie, E. L. Murray, D. R. Schoenberg & N. Sonenberg (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *Journal of Cell Biology*, 170, 913-924.
- Friedman, R. C., K. K. H. Farh, C. B. Burge & D. P. Bartel (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19, 92-105.
- Fu, R., M. T. Olsen, K. Webb, E. J. Bennett & J. Lykke-Andersen (2016) Recruitment of the 4EHP-GYF2 cap-binding complex to tetraproline motifs of tristetraprolin promotes repression and degradation of mRNAs with AU-rich elements. *Rna*, 22, 373-382.
- Fukao, A., Y. Mishima, N. Takizawa, S. Oka, H. Imataka, J. Pelletier, N. Sonenberg, C. Thoma & T. Fujiwara (2014) MicroRNAs Trigger Dissociation of eIF4AI and eIF4AII from Target mRNAs in Humans. *Molecular Cell*, 56, 79-89.
- Fukaya, T., H. Iwakawa & Y. Tomari (2014) MicroRNAs Block Assembly of eIF4F Translation Initiation Complex in Drosophila. *Molecular Cell*, 56, 67-78.
- Fukaya, T. & Y. Tomari (2011) PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation in vitro. *Embo Journal*, 30, 4998-5009.
- Fukaya, T. & Y. Tomari (2012) MicroRNAs Mediate Gene Silencing via Multiple Different Pathways in Drosophila. *Molecular Cell*, 48, 825-836.

- *Gingras, A. C., B. Raught & N. Sonenberg (1999) eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 913-963.
- Giovannone, B., E. Lee, L. Laviola, F. Giorgino, K. A. Cleveland & R. J. Smith (2003) Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 31564-31573.
- Henke, J. I., D. Goergen, J. F. Zheng, Y. T. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann & M. Niepmann (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo Journal*, 27, 3300-3310.
- *Hinnebusch, A. G. & J. R. Lorsch (2012) The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a011544.
- *Houseley, J. & D. Tollervey (2009) The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, 136, 763-776.
- Huntzinger, E., J. E. Braun, S. Heimstadt, L. Zekri & E. Izaurralde (2010) Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *Embo Journal*, 29, 4146-4160.
- Huntzinger, E., D. Kuzuoglu-Ozturk, J. E. Braun, A. Eulalio, L. Wohlbold & E. Izaurralde (2013) The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 41, 978-994.
- *Iwakawa, H. O. & Y. Tomari (2015) The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, 25, 651-665.
- *Jonas, S. & E. Izaurralde (2015) NON-CODING RNA Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16, 421-433.
- Joshi, B., A. Cameron & R. Jagus (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry*, 271, 2189-2203.
- Kamenska, A., W. T. Lu, D. Kubacka, H. Broomhead, N. Minshall, M. Bushell & N. Standart (2014) Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Research*, 42, 3298-3313.
- Khaleghpour, K., A. Kahvejian, G. De Crescenzo, G. Roy, Y. V. Svitkin, H. Imataka, M. O'Connor-McCourt & N. Sonenberg (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 5200-5213.
- Kozlov, G., N. Safaei, A. Rosenauer & K. Gehring (2010) Structural Basis of Binding of P-body-associated Proteins GW182 and Ataxin-2 by the MLE Domain of Poly(A)-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 13599-13606.
- Kryszke, M. H., B. Adjériou, F. F. Liang, H. Chen & F. Dautry (2016) Post-transcriptional gene silencing activity of human GIGYF2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475, 289-294.
- Kubacka, D., A. Kamenska, H. Broomhead, N. Minshall, E. Darzynkiewicz & N. Standart (2013) Investigating the Consequences of eIF4E2 (4EHP) Interaction with 4E-Transporter on Its Cellular Distribution in HeLa Cells. *Plos One*, 8, e72761.
- Lau, N. C., A. Kolkman, F. M. A. van Schaik, K. W. Mulder, W. Pijnappel, A. J. R. Heck & H. T. M. Timmers (2009) Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochemical Journal*, 422, 443-453.
- Lazzaretti, D., I. Tournier & E. Izaurralde (2009) The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 15, 1059-1066.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum & V. Ambros (1993) THE C-ELEGANS HETEROCHRONIC GENE LIN-4 ENCODES SMALL RNAs WITH ANTISENSE COMPLEMENTARITY TO LIN-14. *Cell*, 75, 843-854.
- Liu, J. D., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor & G. J. Hannon (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 1437-1441.
- Lu, W. T., A. Wilczynska, E. Smith & M. Bushell (2014) The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep. *Biochemical Society Transactions*, 42, 166-172.

- Mathonnet, G., M. R. Fabian, Y. V. Svitkin, A. Parsyan, L. Huck, T. Murata, S. Biffo, W. C. Merrick, E. Darzynkiewicz, R. S. Pillai, W. Filipowicz, T. F. Duchaine & N. Sonenberg (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317, 1764-1767.
- Mathys, H., J. Basquin, S. Ozgur, M. Czarnocki-Cieciura, F. Bonneau, A. Aartse, A. Dziembowski, M. Nowotny, E. Conti & W. Filipowicz (2014) Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular Cell*, 54, 751-765.
- Mauxion, F., B. Preve & B. Seraphin (2013) C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *Rna Biology*, 10, 267-276.
- Meijer, H. A., Y. W. Kong, W. T. Lu, A. Wilczynska, R. V. Spriggs, S. W. Robinson, J. D. Godfrey, A. E. Willis & M. Bushell (2013) Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Science*, 340, 82-85.
- Mersman, D. P., H. N. Du, I. M. Fingerman, P. F. South & S. D. Briggs (2009) Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes & Development*, 23, 951-962.
- Moretti, F., C. Kaiser, A. Zdanowicz-Specht & M. W. Hentze (2012) PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 603-608.
- Morita, M., L. W. Ler, M. R. Fabian, N. Siddiqui, M. Mullin, V. C. Henderson, T. Alain, B. D. Fonseca, G. Karashchuk, C. F. Bennett, T. Kabuta, S. Higashi, O. Larsson, I. Topisirovic, R. J. Smith, A. C. Gingras & N. Sonenberg (2012) A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 3585-3593.
- Mulder, K. W., A. Inagaki, E. Cameroni, F. Mousson, G. S. Winkler, C. De Virgilio, M. A. Collart & H. T. M. Timmers (2007) Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 176, 181-192.
- Nishimura, T., Z. Padamsi, H. Fakim, S. Milette, W. H. Dunham, A. C. Gingras & M. R. Fabian (2015) The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Reports*, 11, 1425-1436.
- Nottrott, S., M. J. Simard & J. D. Richter (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 1108-1114.
- Olsen, P. H. & V. Ambros (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*, 216, 671-680.
- Orom, U. A., F. C. Nielsen & A. H. Lund (2008) MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*, 30, 460-471.
- Ozgur, S., J. Basquin, A. Kamenska, W. Filipowicz, N. Standart & E. Conti (2015) Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. *Cell Reports*, 13, 703-711.
- Pestova, T. V., I. N. Shatsky & C. U. T. Hellen (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: The 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 6870-6878.
- Peter, D., R. Weber, F. Sandmeir, L. Wohlbold, S. Helms, P. Bawankar, E. Valkov, C. Igreja & E. Izaurralde (2017) GIGYF1/2 proteins use auxiliary sequences to selectively bind to 4EHP and repress target mRNA expression. *Genes & Development*, 31, 1147-1161.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier & P. A. Sharp (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, 21, 533-542.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand & W. Filipowicz (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 microRNA in human cells. *Science*, 309, 1573-1576.

- Ramirez, C. C. A., P. Hubbe, N. Mandel & J. Bethune (2018) 4EHP-independent repression of endogenous mRNAs by the RNA-binding protein GIGYF2. *Nucleic Acids Research*, 46, 5792-5808.
- Rom, E., H. C. Kim, A. C. Gingras, J. Marcotrigiano, D. Favre, H. Olsen, S. K. Burley & N. Sonenberg (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 13104-13109.
- Rouya, C., N. Siddiqui, M. Morita, T. F. Duchaine, M. R. Fabian & N. Sonenberg (2014) Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 20, 1398-1409.
- Sachs, A. B. & J. A. Deardorff (1992) TRANSLATION INITIATION REQUIRES THE PAB-DEPENDENT POLY(A) RIBONUCLEASE IN YEAST. *Cell*, 70, 961-973.
- Sakai, A., T. Chibazakura, Y. Shimizu & F. Hishinuma (1992) MOLECULAR ANALYSIS OF POP2 GENE, A GENE REQUIRED FOR GLUCOSE-DEREPRESSION OF GENE-EXPRESSION IN SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Nucleic Acids Research*, 20, 6227-6233.
- Schirle, N. T. & I. J. MacRae (2012) The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science*, 336, 1037-1040.
- Schopp, I. M., C. C. A. Ramirez, J. Debeljak, E. Kreibich, M. Skribbe, K. Wild & J. Bethune (2017) Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nature Communications*, 8, 15690.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon & L. Joshua-Tor (2004) Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305, 1434-1437.
- Thermann, R. & M. W. Hentze (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, 447, 875-878.
- Tollenaere, M. A. X., C. Tiedje, S. Rasmussen, J. C. Nielsen, A. C. Vind, M. Blasius, T. S. Batth, N. Mailand, J. V. Olsen, M. Gaestel & S. Bekker-Jensen (2019) GIGYF1/2-Driven Cooperation between ZNF598 and TTP in Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Signaling. *Cell Reports*, 26, 3511-3521.
- Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. J. Chen, C. L. Denis & R. Parker (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in Saccharomyces cerevisiae. *Cell*, 104, 377-386.
- Uchida, N., S. Hoshino & T. Katada (2004) Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1383-1391.
- Vasudevan, S., Y. C. Tong & J. A. Steitz (2007) Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931-1934.
- Vetter, I. R., A. Arndt, U. Kutay, D. Gorlich & A. Wittinghofer (1999) Structural view of the Ran-importin beta interaction at 2.3 angstrom resolution. *Cell*, 97, 635-646.
- Villaescusa, J. C., C. Buratti, D. Penkov, L. Mathiasen, J. Planaguma, E. Ferretti & F. Blasi (2009) Cytoplasmic Prepl Interacts with 4EHP Inhibiting Hoxb4 Translation. *Plos One*, 4, e5213.
- Wahle, E. & G. S. Winkler (2013) RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Regulatory Mechanisms*, 1829, 561-570.
- Wakiyama, M., K. Takimoto, O. Ohara & S. Yokoyama (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & Development*, 21, 1857-1862.
- Wolf, J., E. Valkov, M. D. Allen, B. Meineke, Y. Gordiyenko, S. H. McLaughlin, T. M. Olsen, C. V. Robinson, M. Bycroft, M. Stewart & L. A. Passmore (2014) Structural basis for Pan3 binding to Pan2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation. *Embo Journal*, 33, 1514-1526.
- Yamashita, A., T. C. Chang, Y. Yamashita, W. M. Zhu, Z. P. Zhong, C. Y. A. Chen & A. B. Shyu (2005) Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 1054-1063.

- Zekri, L., D. Kuzuoglu-Ozturk & E. Izaurralde (2013) GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *Embo Journal*, 32, 1052-1065.
- Zhang, L., L. Ding, T. H. Cheung, M. Q. Dong, J. Chen, A. K. Sewell, X. Liu, J. R. Yates & M. Han (2007) Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2. *Molecular Cell*, 28, 598-613.
- Zhang, Y., Q. Y. Sun, R. H. Yu, J. F. Guo, B. S. Tang & X. X. Yan (2015) The contribution of GIGYF2 to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurological Sciences*, 36, 2073-2079.
- Zipprich, J. T., S. Bhattacharyya, H. Mathys & W. Filipowicz (2009) Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 15, 781-793.
- Zuberek, J., D. Kubacka, A. Jablonowska, J. Jemielity, J. Stepinski, N. Sonenberg & E. Darzynkiewicz (2007) Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 13, 691-697.